

Entwicklung einer Ultraschallsensorik zur Online-Charakterisierung der Aufreinigung von Proteinen.

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Stephanie Holz

geboren am 30.08.1982, in Hameln

2011

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 09.12.2011

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die interessante Aufgabenstellung und das gute, offene Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferats und die unermüdliche Projektbetreuung.

Herrn Dr. Sascha Beutel danke ich für seine stete Unterstützung und das fleißige Korrekturlesen.

Bei den Projektpartnern möchte ich mich für die gute und fruchtbare Zusammenarbeit bedanken; bei der Firma TF Instruments, die mit ihrem Gerät erst das Projekt ermöglicht hat. Unter der Leitung von Herrn Wilt und Herrn Jörg Peters hat der Proteinmonitor durch die sachkundigen Umbauten von Herrn Alexander Maier immer weiter Gestalt angenommen. Herrn Wolfgang Künnecke dem Geschäftsführer der Firma TRACE bin ich für seine Projektkoordination und den steten Input ebenfalls sehr dankbar. Ich denke neue Ideen und Forscherdrang kamen im Projekt nie zu kurz. Seinem Mitarbeiter Herrn Michael Hartlep und ehemaligen Mitarbeiter Herrn Matthias Lehmann –ich hoffe sie genießen ihren Ruhestand- danke ich ebenfalls für den freundschaftlichen, wissenschaftlichen Diskurs. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Roland Winter und vor allem seiner Mitarbeiterin Frau Dr. Karin Weise für die theoretische und oft sehr praktische Hilfe. Ich danke der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, insbesondere Herrn Dr. Daniel Riechers, für die Fokuskontrolle des Projekts. Der Firma Cellgenix danke ich für die Bereitstellung der Proben und das Vertrauen, dem Projekt eine Aufgabenstellung zu übertragen. Frau Monique Ramunno danke ich für den unkomplizierten Kontakt und den Einblick und sogar Einbezug in ihre Projektarbeit. Ein spezieller Dank gilt dem BMBF für die Förderung des Projektes über den im Rahmen der „Forschung für die Produktion von morgen“ abgehaltenen Wettbewerbes für „Mess- und Regelungssysteme für verfahrenstechnische Fertigungsprozesse.“ Aus dem sich für unser Projekt sogar eine neue Kooperation andeutet.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Kollegen Herrn Dr. Patrick Lindner, für die Zusammenarbeit, und Herrn Marc Stanke, den es nun nach Stuttgart verschlagen hat und der trotzdem mit den Gedanken immer dem Projekt treu ist, danken. Email ist doch eine tolle Erfindung.

Ich danke den guten Geistern des Instituts Frau Cornelia Alic, Frau Angelika Behnsen, Herrn Martin Pähler und besonders Frau Martina Weiß.

Mein Dank gilt auch der Mechanikwerkstatt und natürlich der Elektronik-Werkstatt, Herrn Dipl.-Ing. Thorleif Hentrop und Herrn Burkhard Probst, die stets schnelle Hilfe parat hatten.

Weiterer Dank gilt den Mitgliedern des gesamten Arbeitskreises für die gute Zusammenarbeit und den guten Zusammenhalt. Ein Spezieller Dank geht an Isabelle und Jörg, die so fleißig gelesen haben.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Freunden und natürlich meiner Familie und meinem Freund, die mich schon während des Studiums und jetzt sogar bis zur Dissertation stets unterstützt haben. Ohne sie wäre das alles nicht möglich gewesen. Vielen Dank!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	XVI
Abkürzungsverzeichnis	XIX
Kurzzusammenfassung	XXI
Abstract	XXII
1 Einleitung.....	1
2 Zielsetzung.....	3
3 Theoretischer Teil.....	5
4 Praktischer Teil.....	26
4.1 Die Entwicklung des Messgerätes	26
4.1.1 Einfluss der Pumpgeschwindigkeit auf die Ultraschallmessung	34
4.2 Ultraschallmessungen	38
4.2.1 Temperatureinfluss auf die Ultraschallgeschwindigkeit.....	38
4.2.2 Reproduzierbarkeit.....	45
4.2.3 Ansprechzeit	46
4.2.4 Einfluss der Salzkonzentration auf die Ultraschallgeschwindigkeit	47
4.2.4.1 Messungen im Durchfluss.....	53
4.2.4.2 Hofmeister-Reihe	55
4.2.5 Proteinanalyse mittels Ultraschall.....	61
4.2.5.1 Untersuchung der Modellproteine RNase A, α -Chymotrypsin und Lysozym mittels Ultraschall	63
4.2.5.2 Bestimmung der Nachweisgrenze (NWG) für die Modellproteine	64
4.2.5.3 Konformationsänderungen	65
4.2.5.3.1 Untersuchung des Einflusses verschiedener Zusätze (Cosolventien).....	66
4.2.5.3.2 Temperaturdenaturierung	69
4.2.5.3.3 pH-Einfluss	71
4.2.5.4 Die Proteinbestimmung im Durchfluss	72

4.2.5.4.1	Überwachung der Denaturierung von Lysozym mit Harnstoff im Durchfluss	74
4.2.6	Kartoffelprotein-Aufreinigung mittels Membranadsorbertechnologie	76
4.2.7	Platelet Derived Growth Factor (PDGF-BB)	84
4.2.7.1	Ultraschallanalyse der PDGF-BB-Proben	88
4.3	Weiterführende Einsatzgebiete: „nicht wässrige Systeme“	95
4.3.1	Ionische Flüssigkeiten (IL)	95
4.3.1.1.1	[EMIM][EtSO ₄]	96
4.3.1.1.2	[EMIM][MeOHPO ₂]	97
4.3.1.1.3	[EMIM][triflat]	98
4.3.1.2	Triethylenglykol (TEG)	99
5	Zusammenfassung und Ausblick	107
6	Anhang	110
6.1	Dialyseeinheit	110
6.2	Blasenfallen und Degasser	112
6.3	Das Arbeiten mit den Messgeräten	114
6.3.1	Messung mit der statischen Zelle und der Durchflusszelle mit der ursprünglichen Software von TF-Instruments	114
6.3.2	Messung mit der statischen Zelle, der Durchflusszelle und dem Proteinmonitor mit der neuen Software	115
6.3.3	Vorschrift zur Benutzung der statischen Zelle	116
6.3.4	Vorschrift zur Benutzung des Durchflussgeräts und des Proteinmonitors	117
6.3.5	Initialisierung	117
6.3.6	Berechnungen	118
6.3.6.1	Genauigkeit und Präzision	118
6.3.6.2	Nachweisgrenze	119
6.3.7	Herstellung der Verdünnungsreihen	119
6.4	Ergänzung der Messdaten zum Praktischen Teil	120
6.4.1	Messdatenreihen mit Bestimmtheitsgrad der Salzmessungen aus 4.2.4	122
6.4.2	Anhang Denaturierung von Proteinen	127
6.4.2.1	Harnstoffdenaturierung von Lysozym und Ovalbumin	127

6.4.2.2	Ergänzung der Temperaturdenaturierung von α -Chymotrypsin	128
6.4.2.3	Denaturierung mittels Harnstoff	129
6.5	Anhang PDGF-BB	129
6.5.1	Strukturelle Analyse des PDGF-BB	129
6.5.2	Analyse der Morphologie des PDGF-BB	134
6.5.3	Probenvorbereitung und verwendetet Lösungen	137
6.6	Herstellung der Stammlösungen und Verdünnungsreihen	138
6.7	BTEE-Aktivitätstest.....	138
6.8	Bradford Proteinnachweis	140
6.9	Verwendete Chemikalien.....	141
6.10	DSA 5000 Dichte- und Schallgeschwindigkeitsmessgerät.....	142
7	Literaturverzeichnis	143
8	Lebenslauf.....	155

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die von der Fledermaus ausgesandten Ultraschallwellen werden vom Insekt reflektiert ²	1
Abbildung 2: AFM-Aufnahmen (atomic force microscopy) der Fibrillenbildung bei Insulin. Bild A zeigt kleinere Aggregate des nativen, Bild B fibrillogenes Insulin ¹¹	3
Abbildung 3: Darstellung der Wellenlänge (λ) links und Phase (T) rechts einer harmonischen Schwingung ¹⁵	5
Abbildung 4: Diagramm des Schallspektrums ¹⁴	6
Abbildung 5: Mikroturbulenzen bei einer Frequenz von 11 kHz um eine 272 μ m Radius gro-se Kavitationsblase ¹⁴	8
Abbildung 6: Asymmetrisches Kollabieren einer Kavitationsblase an einer Phasengrenze nach ¹⁴	8
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Pfeifen-Reaktors zur hydrodynamischen Kavitationsblasenbildung ²³	9
Abbildung 8: Schematisch gezeigt sind von links nach rechts die Durchmessererfassung, Durchhangregelung, Höhenmessung, Füllstandsmessung und das Erfassen von Objekten, bzw. Fehlstellen, in der Automatisierungstechnik ¹⁷	11
Abbildung 9: Mögliche Transducer (T) und Receiver (R) Anordnungen für Ultraschallmesssysteme. Abbildung nach Quelle ³⁰	12
Abbildung 10: Schematischer Aufbau der Ultraschallströmungsmesser nach Doppler- (A) und Laufzeitverfahren (B) nach ³⁰	14
Abbildung 11: Schematische Darstellung der möglichen Messanordnung für Reaktorüberwachung, nach ⁷⁴	16

Abbildung 12: Interaktionsmöglichkeiten zwischen Ultraschallwellen und Zellen ⁸³	18
Abbildung 13: Der Ultraschalleinfluss auf Zellen, nach ²³	19
Abbildung 14: Schema der möglichen Varianten des Aufbaus von Ultraschallsonden, nach ⁸⁴	20
Abbildung 15: Foto von Pyrex Glaskügelchen in einem stehenden Ultraschallfeld bei einer Anregungsfrequenz von 670 kHz ²	21
Abbildung 16: Schema des Effekts einer stehenden Welle auf Teilchen, hier Blasen, nach ¹⁴ . Die Blasen sammeln sich je nach Größe in den Knotenpunkten (1) oder Antiknotenpunkten (2).....	21
Abbildung 17: Schematischer Aufbau eines Bioreaktors mit akustischem Zellfilter, nach ¹¹⁹	22
Abbildung 18: Aufbau einer URT-Resonatorzelle, nach ¹²⁵	24
Abbildung 19: Prinzip des Aufbaus einer stehenden Welle in der URT-Messzelle, nach ¹²⁵	24
Abbildung 20: Beispiel verschiedener unit operations eines Aufreinigungsprozesses ¹²⁸	26
Abbildung 21: Statisches URT-Messgerät von TF-Instruments (Heidelberg, Deutschland). Die Temperiereinheiten (A) und der Messblock (B) sind gezeigt..	27
Abbildung 22: Das statisches Messgerät (A) ist in Draufsicht, das Durchflusssystem mit Pumpe (B) in Gänze gezeigt.....	28
Abbildung 23: Schematischer Aufbau des Durchflussmesssystems zur Simulation einer Prozessanalytik.	29
Abbildung 24: Laboraufbau der Messanlage. Die Messeinheit ist an den Thermostat im Vordergrund angeschlossen. Die Steuereinheit regelt die Temperatur der Messzellen. Die Probe und Referenz werden aus den	

Vorlagebehältern mit der Pumpe entnommen. Nach dem Passieren der Blasenfallen gelangt die Lösung über die Dialyse in die Messzellen der Messeinheit. Der PC dient der Datenaufnahme und –auswertung.....	30
Abbildung 25: Foto des Proteinmonitor Prototypen. Im unteren Segment des Kopfteils (A) befinden sich die Pumpe und die Messeinheit. Darunter ist die Temperiereinheit (B) angebracht.....	31
Abbildung 26: Schematischer Aufbau des Proteinmonitors.	32
Abbildung 27: Die Entwicklung des Messgeräts auf einen Blick. Zu sehen ist die parallele Entwicklung der Hard- und Software.....	33
Abbildung 28: Vergleich der Ergebnisse der Messungen am statischen und Durchfluss-System. Die Präzision der Messungen ist auf Grund des Maßstabs nicht zu sehen.	34
Abbildung 29: Vergleich der Messwerte des statischen Systems verschieden konzentrierter Natriumhydrogencarbonat-Lösungen mit den Daten der Durchflussmesszelle bei unterschiedlichen Pumpgeschwindigkeiten.	35
Abbildung 30: Verlauf einer FI-Analyse mit Harnstofflösungen verschiedener Konzentration. Zwischen den Messungen wurden die Messzellen mit deionisiertem Wasser gespült.	36
Abbildung 31: Vergleich der Messungen der Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit verschieden konzentrierter Harnstofflösung des statischen und des Durchflusssystem. Die FIA-Daten sind dem Graphen aus Abbildung 30 entnommen. Die Präzision (siehe Kapitel 6.3.6.1) der Messwerte ist nur für den Wert bei 0,1 mol/L beim gewählten Maßstab im Graphen zu sehen.	37
Abbildung 32: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Ultraschallgeschwindigkeit, adiabatischer Kompressibilität und Dichte.....	39
Abbildung 33: Über die Gleichung 7 aus Literaturdaten, für die adiabatische Kompressibilität und Dichte, berechnete Ultraschallgeschwindigkeit für Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur.	39

Abbildung 34: Graphischer Vergleich der Daten für Wasser zwischen der Berechnung, nach der Laplace-Formel ⁶ aus Literaturdaten für Kompressibilität und Dichte, und den in Gelb gezeigten, mit dem statischen URT-System gemessenen Daten.	40
Abbildung 35: Höhere Auflösung des Graphen aus Abbildung 34 mit Ergänzung der Messwerte (über den Datenreihen) und berechneten Werte (unter den Datenreihen).	41
Abbildung 36: Mit dem statischen URT-System gemessener Einfluss der Temperatur auf die Ultraschallgeschwindigkeit von deionisiertem Wasser.	42
Abbildung 37: Eine Beispielmessung über ~6 Tage mit Luftkühlung und der „alten“ Software (der Original Software von TF Instruments). Rechts ist die Temperatur in blau abzulesen. Die Temperatur sinkt zur Nacht ab (hellblaue Pfeile) und steigt zum Tag an (dunkelblaue Pfeile).	43
Abbildung 38: Beispielmessung einer Intervallzugabe von 0,04 % (m/m) NaCl-Lösung bei konstanter Temperatur über 25 h. Die blauen Daten beziehen sich auf die rechte Achse und geben die Temperatur wieder.	44
Abbildung 39: Messung einer Intervallzugabe von 0,04 % (m/m) NaCl-Lösung über 14.000 Messwerte. Die Erzeugung eines Messwerts beträgt 6-7 s. In orange ist der Verlauf der Ultraschallmessung in der Messzelle 1 zu verfolgen. Sie wird abwechselnd mit deionisiertem Wasser und NaCl-Lösung gespült.	45
Abbildung 40: Graphische Darstellung des Ansprechverhaltens des Messsystems. Bestimmung des t ₉₀ -Wertes, dem Punkt an dem der Messwert zu 90 % erreicht ist. Gezeigt sind dazu die Messwerte der Messzelle 1 (orange Punkte) und die verwendeten Eckdaten (Maximum, t ₉₀ -Wert und Minimum in Blau).	47
Abbildung 41: Messung einer 4 % (m/m) NaCl-Lösung (Saline) im Temperaturbereich 15-80 °C im Vergleich zum Verlauf der Messung von deionisiertem Wasser gemessen (DI) und berechnet (Berechnet). Die hellgelbe Kurve gibt die Differenz der beiden gemessenen Datenreihen an und bezieht sich als einzige auf die rechte x-Achse.	48

Abbildung 42: Beispielmessreihen zum Verhalten der Ultraschallgeschwindigkeit als Differenz zum Lösungsmittel Wasser verschieden konzentrierter Salzlösungen, nach ¹²⁵	49
Abbildung 43: Die Änderung der Ultraschallgeschwindigkeit ist als Differenz zwischen deionisiertem Wasser und den wässrigen Lösungen ermittelt und als Funktion der Konzentration aufgetragen. Die Präzision ist auf Grund des Maßstabs nur punktuell im Graphen sichtbar.....	50
Abbildung 44: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Messung der 1 mol/L Salzlösungen aus Abbildung 42. Vergleich der Einflüsse der Kationen und Anionen auf die Ultraschallgeschwindigkeit.	52
Abbildung 45: Orange kennzeichnet die Messreihen der statischen, das Blau die der Durchflussmessung.	53
Abbildung 46: Schematische Darstellung einer Auswahl an Kationen und Anionen geordnet nach ihren chaotropen und kosmotropen Eigenschaften, nach ^{132, 137}	57
Abbildung 47: Werte der Durchflussmessung der Ultraschallgeschwindigkeitsdifferenzen verschiedener Natriumsalze im Vergleich zur Hofmeisterreihe.....	58
Abbildung 48: Konzentrations-Differenz-Ultraschallgeschwindigkeits-Verlauf einer Natri-umiodid Messung bis 2 mol/L in der statischen Messzelle.	59
Abbildung 49: Schematische Darstellung der vier Ebenen der Struktur von Proteinen ⁷	62
Abbildung 50: Daten zu den verwendeten Proteinen RNase A, Lysozym und α -Chymotrypsin.	63
Abbildung 51: Messwerte der Kalibrationen für die Modellproteine zur Berechnung der unteren NWG. Die eingesetzten Puffer sind Tabelle 13 zu entnehmen.	64
Abbildung 52: Messung von RNase A- und Lysozym-Proben mit unterschiedlichen Anteilen Kaliumsulfat. Die Proteine wurden in einer	

Konzentration von 0,5 %(m/m) vorgelegt. Die Präzision ist so gering, dass sie beim gewählten Maßstab nur teilweise abgebildet wurde. Die Messungen wurden in Kalium-Phosphat-Puffer (pH 5,5; 10mmol/L) durchgeführt.....	66
Abbildung 53: Messung des Einflusses von Ethanol in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Proteine Lysozym und RNase A. Die Messungen wurden in Phosphat-Puffer (pH 5,5; 10mmol/L) durchgeführt.	67
Abbildung 54: Einfluss von Harnstoff-Lösung verschiedener Konzentration auf die Proteinsignale in der Ultraschallmessung. Die Messungen wurden in Phosphat-Puffer (pH 5,5; 10mmol/L) durchgeführt.	68
Abbildung 55: Die Probe mit 0,5 %(m/m) Lysozym wurden parallel zu einer Referenzprobe auf 80 °C erhitzt und anschließend abgekühlt. Der Graph zeigt, dass das Maximum bei beiden Kurven (Referenz und Probe) vor dem Erreichen der Endtemperatur überschritten wurde.	69
Abbildung 56: Verlauf der Kurve der Probe mit 0,5 %(m/m) Lysozym. In rot ist die Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit gezeigt. Die Kurve erfährt bei ca. 70 °C einen scharfen Knick. Die Temperatur ist in blau dargestellt. Die Proteinprobe wurde in keinem speziell physiologischen Puffer vermessen. Die irreversible Denaturierung zeigt sich in dem anhaltend abgesunkenem Signal.	70
Abbildung 57: Vergleich des Einflusses verschiedener pH-Werte auf die Ultraschallgeschwindigkeit bei 0,5 %(m/m) Proteinlösungen.	71
Abbildung 58: Einfluss des pH-Werts auf die Oberflächenladung eines Proteins. Der iso-elektrische Punkt (pI) bezeichnet den pH-Wert für neutrales Verhalten ¹³²	72
Abbildung 59: Graph der Messung einer 0,5 %(m/m) α -Chymotrypsin Probe in Puffer. Zu Beginn der Messung werden die mit deionisiertem Wasser gefüllten Messkammern mit Puffer gespült. Dies ist am steilen Anstieg bis 1000 s zu sehen. A zeigt einen negativ und B einen positiv verlaufenen BTEE-Aktivitätstest.....	73
Abbildung 60: Denaturierung der Lysozymproben in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration und der Zeit. Durch die Messung im Kreislauf kommt es	

zur Rückvermischung in der Probe und damit zu Schwankungen während der Messung.	74
Abbildung 61: Fluoreszenzintensität von Lysozym in Gegenwart von Harnstoff. Die Proben wurden mit einer 1:50 Verdünnung vermessen.	75
Abbildung 62: Links ist die Struktur des Patatins ¹⁵⁹ (A) und rechts sind, als Vertreter der Protease-Inhibitoren, die Strukturen des Bowman Birk ¹⁶⁰ (B) und des Kunitz ¹⁶¹ (C) Inhibitors gezeigt.	76
Abbildung 63: Verlauf der einzelnen Schritte während der Aufreinigung der Proteine durch Membranadsorber. Darstellung der gemessenen UV-Absorption in türkis und der Leitfähigkeit in blau. Die Detektoren sind direkt hinter der Membran angeschlossen, nach ¹⁶⁸	77
Abbildung 64: Vergrößerter Ausschnitt eines realen Messverlauf einer mehrere Prozessläufe umfassenden Messung an der FPLC. Die UV-Absorption (rot) und Leitfähigkeit (schwarz) sind gezeigt, nach ¹⁶⁸	79
Abbildung 65: Gemessene UV-Absorption (rot) und Leitfähigkeit (schwarz) einer 27 Prozesszyklen umfassenden Messung der S-Membranadsorber im kleineren Maßstab an der FPLC, nach ¹⁶⁸	80
Abbildung 66: Verfolgung der Prozessläufe mittels Ultraschallmessung. In Rot sind die in der Messzelle 1 gemessenen Absolutwerte der Ultraschallgeschwindigkeit dargestellt.	81
Abbildung 67: Einsatz des Proteinmonitors zur Verfolgung der Elution. In Rot sind die Messwerte der Messzelle 1 und in Gelb die der Messzelle 2 gezeigt. Die blauen Werte beziehen sich auf die rechte y-Achse und geben die Differenz der beiden Messzellen zueinander an.	82
Abbildung 68: Gemessene Daten der UV-Absorption bei der Aufreinigung der Protease-Inhibitoren mittels S-Membranadsorber mit Rückführung des Eluenten, nach ¹⁶⁸	82
Abbildung 69: Verfolgung der Aufreinigung der PIs mit dem Proteinmonitor. Vergleichsdaten zum Lauf aus Abbildung 68.	83

Abbildung 70: Die Bande des Patatin liegen wie erwartet bei 40 kDa die Banden der Protease-Inhibitoren konzentrieren sich bei 20 kDa. Auch weit unter 20 kDa sind noch Banden gut erkennbar (SDS-PAGE, Tris-HCl 18 % mit Silberfärbung) ¹⁶⁸	84
Abbildung 71: β -Faltblätter des monomeren PDGF-BB (Proteindatenbank: 1 PDGF) ¹⁷¹	85
Abbildung 72: HPLC-Lauf verschieden konzentrierter Proben aus einem Protokoll von Cellgenix, Freiburg ¹⁷⁴ . Die Nummerierung ist nachträglich eingefügt worden.	86
Abbildung 73: Auswertung des HPLC-Laufs von PDGF-BB ¹⁷⁴	87
Abbildung 74: Ultraschallmessung während der stufenweisen Aufheizung der Probe 225. In Dunkelgrün sind die Differenzwerte in der Ultraschallgeschwindigkeit gezeigt. In Hellgrün, darüber liegend, sind die Differenzwerte geglättet über 21 Messwerte abgebildet.	89
Abbildung 75: Vergleich der Ultraschallmessungen der Probe 225 (225 μ /ml). Die Differenzwerte wurden über 5 Werte geglättet um gerätbedingte Temperaturschwankungen ausschließen zu können und die Übereinstimmung der Messläufe zu unterstreichen.	90
Abbildung 76: Vergleich der Differenz-Ultraschallgeschwindigkeiten der v (grün dargestellt) und n Proben (Orange dargestellt) 200 – 275. (*Die Messung wurde bei 25 °C durchgeführt.).....	91
Abbildung 77: Vergrößerte Darstellung der Abbildung 76.....	91
Abbildung 78: Maximalwerte der Ultraschallgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Konzentration der vorgelegten Protein-Probe.	92
Abbildung 79: Messwerte der Ultraschallgeschwindigkeit der Proben 200 bis 300 bei der Temperierung auf 60 °C für 30 min.....	93
Abbildung 80: Ergebnisse der Messung der Proben auf 60 °C für 30 min.	93

Abbildung 81: Strukturformel des 1-ethyl-3-methylimidazolium Ethylsulfat.....	96
Abbildung 82: Strukturformel des 1-ethyl-3-methylimidazolium Methylphosphonat.....	97
Abbildung 83: Strukturformel des 1-ethyl-3-methylimidazolium trifluoromethansulfonat.....	98
Abbildung 84: Schematischer Aufbau einer Entfeuchtungsanlage von Erdgas mittels TEG ¹⁸⁴	100
Abbildung 85: Erste Bestimmung des Zusammenhangs Wassergehalt des TEG und Ultraschallgeschwindigkeitsänderung. Gemessen wurde die Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit des wasserverunreinigten TEG gegen deionisiertes Wasser als Referenz.	101
Abbildung 86: Temperatur-Ultraschallgeschwindigkeits-Zusammenhang für Mischungen von TEG mit deionisiertem Wasser. Die Farbabstufung gibt den Gehalt an TEG bzw. Wasser an. Die Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit ist gegen reines Wasser aufgetragen.	102
Abbildung 87: Messung im Bereich von 95-100 % TEG bei 50 °C. In Grün sind die Messwerte dargestellt und in Orange die dazugehörigen Mittelwerte. Ihre Präzision ist im Graphen auf Grund des Maßstabs nicht zu sehen.	103
Abbildung 88: Zwei Beispiele für Prototypen der Dialyseeinheiten der Firma TRACE Analytics, die für dieses Projekt gebaut wurden. Die Zahl gibt die Anzahl der Fasern an.	110
Abbildung 89: Von der Firma TRACE zur Verfügung gestellte Mikroskopaufnahmen der Enden eines Dialysemoduls der Firma TRACE ¹⁹⁰ ...	111
Abbildung 90: Zur Verfügung gestellte Aufnahmen der Bestimmung der Durchmesser der, im Dialysemodul eingesetzten, Hohlfasern ¹⁹⁰	111
Abbildung 91: Blasenfallen der Firma TRACE, TRACE TRAP. Links ist die auseinandergebaute Falle zu sehen und rechts ist die funktionsfähige gezeigt. ..	112

Abbildung 92: Degasser der Firma KNAUER, der im Proteinmonitor zum Einsatz kommt ¹⁹¹	113
Abbildung 93: Schema des Entgasungsprinzips ¹⁹¹ . Zu sehen ist die Teflonhülse, durch die die Gase durch den Unterdruck die Lösung verlassen.	114
Abbildung 94: Im linken Graphen ist die Ultraschallgeschwindigkeitsmessung einer Probe mit großem Konzentrationsgradienten gezeigt. Das Bestimmungsmodell versagt vor dem Erreichen der maximal Konzentration. Die gewählte Frequenz ist nicht länger die korrekte Messfrequenz. Im rechten Bild ist gezeigt, wie die letzten Entwicklungen der Software durch das Erkennen eines Messfrequenzwechsels, das Messen größerer Konzentrationsbereiche ohne Zwischeninitialisierung ermöglichen.	118
Abbildung 95: Messung der Kaliumchlorid-Proben.	122
Abbildung 96: Ergebnis der Ammoniumhydrogencarbonat-Messung.	123
Abbildung 97: Bestimmung des Ultraschallgeschwindigkeit-Konzentration-Zusammenhangs für Natriumchlorid.	123
Abbildung 98: Kalibration für den Zusammenhang Ultraschallgeschwindigkeit-Konzentration für Natriumhydrogencarbonat.	124
Abbildung 99: Messung der Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit im Bereich von 0,005 mol/L bis 1,0 mol/L für Kalziumchlorid.	124
Abbildung 100: Bestimmung des linearen Zusammenhangs für den Konzentrationsbereich von 0-1 mol/L Kaliumdihydrogenphosphat.	125
Abbildung 101: Vergleich der Messreihen von KCl im statischen und im Durchfluss-System gemessen.	125
Abbildung 102: Messungen des statischen und des Durchfluss-Systems von NaCl-Proben.	126
Abbildung 103: Messdaten der NaHCO ₃ -Proben vermessen im statischen im Vergleich zum Durchfluss-System.	126

Abbildung 104: Messdaten der Harnstoff-Denaturierung von Lysozym und Ovalbumin im Vergleich zu den Messdaten der Harnstoffprobe. Gezeigt sind sowohl die Absolutwerte dargestellt durch blaue Balken und die Differenzwerte durch rote Rauten symbolisiert.	127
Abbildung 105: Messung der Ultraschallgeschwindigkeit eines Temperaturverlaufs von 20 °C bis 80 °C mit α -Chymotrypsin in 4 % (m/m) NaCl-Lösung.....	128
Abbildung 106: Darstellung des Differenz-Ultraschallgeschwindigkeits-Verlaufs einer α -Chymotrypsin Temperaturdenaturierung.	128
Abbildung 107: CD-Spektren von PDGF-BB in PBS-Puffer, pH 7,4 vor der Behandlung (links) und nach der Behandlung für 30 min bei 60°C (rechts) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Die Abbildung zeigt die Analysendaten für die erste Versuchsreihe von August 2010.	130
Abbildung 108: CD-Spektren von PDGF-BB in PBS-Puffer, pH 7,4 vor der Behandlung (links) und nach der Behandlung für 30 min bei 60°C (rechts) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Die Abbildung zeigt die Analysendaten für die zweite Versuchsreihe von Januar 2011.	132
Abbildung 109: Sekundärstrukturanalyse des PDGF-BB in PBS-Puffer, pH 7,4 vor und nach der Behandlung für 30 min bei 60°C. Die Abbildung zeigt den Anteil an β -Faltblattstruktur in Abhängigkeit der Proteinkonzentration für die erste (August 2010, links) und zweite Versuchsreihe (Januar 2011, rechts).	133
Abbildung 110: AFM-Bilder der PDGF-BB-Proben mit einer Konzentration von 0,150 mg/mL vor (links) und nach 30 min Behandlung bei 60°C (rechts). Die Höhenskala entspricht in beiden Aufnahmen 2,5 nm.....	134
Abbildung 111: AFM-Bilder der PDGF-BB-Proben mit einer Konzentration von 0,250 mg/mL vor (links) und nach 30 min Behandlung bei 60°C (rechts). Die Höhenskala entspricht in beiden Aufnahmen 2,5 nm.....	135

Abbildung 112: AFM-Bilder der PDGF-BB-Proben (01/2011) mit einer Konzentration von 0,300 mg/mL vor (links) und nach 30 min Behandlung bei 60°C (rechts). Die Höhenskala entspricht in beiden Aufnahmen 3,0 nm.....	135
Abbildung 113: AFM-Bilder der PDGF-BB-Proben (08/2010) mit einer Konzentration von 0,300 mg/mL vor (links) und nach 30 min Behandlung bei 60°C (rechts). Die Höhenskala entspricht in beiden Aufnahmen 3,0 nm.....	136
Abbildung 114: Hydrolyse von N-Benzoyl-L-Tyrosin-Ethylester durch α -Chymotrypsin ¹⁹⁵	139
Abbildung 115: Foto des DAS 5000 der Firma Anton Paar® GmbH ¹⁹⁶	142
Abbildung 116: Schematischer Aufbau der Anton Paar® Dichte- und Schallgeschwindigkeitsmessgeräts ¹⁹⁶	142

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Typische Werte für Ultraschallgeschwindigkeiten in verschiedenen Medien, nach ¹⁸	7
Tabelle 2: Ultraschallsensoren und ihre Methoden nach ³⁰	13
Tabelle 3: Übersicht über akustische Strömungsmessverfahren, nach ⁵⁹	16
Tabelle 4: Ausgewählte Beispiele der Anwendungsbereiche für Ultraschallsensoren nach ^{58, 67}	17
Tabelle 5: Vergleich zweier Kultivierungen von menschlichen Hybridoma-Zellen im Perfusionsreaktor. Der Volumenstrom [1/d] wurde berechnet über den Eintrag von Medium in den Reaktor, bezogen auf die Fermentationszeit und das Fermentationsvolumen. Der tägliche Volumenstrom [L] wurde aus dem Produkt von Volumenstrom und Fermentationsvolumen erhalten, nach ¹¹⁹	23
Tabelle 6: Überblick der Ultraschallanwendungen in der Biotechnologie.	23
Tabelle 7: Die Änderung der Ultraschallgeschwindigkeit in Wasser in Abhängigkeit von der Steigung der Ultraschallgeschwindigkeits-Temperatur-Kurve ¹²⁵	42
Tabelle 8: Bestimmung der Präzision der Extremwerte über 40 Messläufe.	46
Tabelle 9: Bestimmung der Ansprechzeit des Proteinmonitors. Die Zeitangaben sind der Achsenbeschriftung in Abbildung 40 folgend.	46
Tabelle 10: Messwerte der Maxima der Messreihen „DI“ (deionisiertes Wasser) und „Saline“ (4 % (m/m) NaCl-Lösung) im Vergleich.	48
Tabelle 11: Messwerte der statisch und in im Durchfluss gemessenen Salzreihen.	54
Tabelle 12: Messwerte der Bestimmung der Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit des Na-triumiodid im Konzentrationsbereich von 0,001-2 mol/L.	60

Tabelle 13: Nachweisgrenzen (NWG) der untersuchten Modelproteine.....	65
Tabelle 14: Definition der Probenvarianten.....	87
Tabelle 15: Messdaten der Proben.....	94
Tabelle 16: Vergleich der Werte für [EMIM][EtSO ₄] bei 25 °C.....	97
Tabelle 17: Vergleich der Werte für [EMIM][MeOHPO ₂] bei 25 °C.....	98
Tabelle 18: Vergleich der Werte für [EMIM][triflat] bei 25 °C.....	99
Tabelle 19: Messwerte (MW) zur Abbildung 87 der Bestimmung der erfüllbaren Randbedingungen. Die Messung erfolgte bei 50 °C, der mittleren geforderten Arbeitstemperatur.	104
Tabelle 20: Genauigkeit der URT-Messung für TEG bei 25 °C. Vergleich mit Literaturdaten.....	104
Tabelle 21: Auswertung der Messreihe nach der Auflösungs- und Messgrenze des URT-Systems. Die Präzision der Messungen ist im Kontext zur punktuellen Steigung gezeigt.	105
Tabelle 22: Zusammenfassung der Ergebnisse der Kompatibilität des URT-Messsystem zum Einsatz in einer Gastrockenanlage zur Analyse des Wassergehalts des TEG.	106
Tabelle 23: Verwendete Literaturdaten und daraus berechnete Werte der Ultraschallgeschwindigkeit in Wasser für den Temperaturbereich von 0-100 °C.	120
Tabelle 24: Auszug der Daten der Ultraschallgeschwindigkeitsmessung von Wasser im Bereich von 10-80 °C.	121
Tabelle 25: Sekundärstrukturanalyse der konzentrationsabhängigen CD-Messungen vor Behandlung der Proteinproben der ersten Versuchsreihe von August 2010. Die CD-Spektren des PDGF-BB wurden mittels des Analyseprogramms CDNN (Referenzset NNET_33) ausgewertet.	131

Tabelle 26: Sekundärstrukturanalyse der konzentrationsabhängigen CD-Messungen nach Behandlung der Proteinproben für 30 min bei 60°C der ersten Versuchsreihe von August 2010. Die CD-Spektren des PDGF-BB wurden mittels des Analyseprogramms CDNN (Referenzset NNET_33) ausgewertet.....	131
Tabelle 27: Sekundärstrukturanalyse der konzentrationsabhängigen CD-Messungen vor Behandlung der Proteinproben der zweiten Versuchsreihe von Januar 2011. Die CD-Spektren des PDGF-BB wurden mittels des Analyseprogramms CDNN (Referenzset NNET_33) ausgewertet.....	132
Tabelle 28: Sekundärstrukturanalyse der konzentrationsabhängigen CD-Messungen nach Behandlung der Proteinproben für 30 min bei 60°C der zweiten Versuchsreihe von Januar 2011. Die CD-Spektren des PDGF-BB wurden mittels des Analyseprogramms CDNN (Referenzset NNET_33) ausgewertet.....	133
Tabelle 29: Zusammenfassung der Analysenwerte zur Partikelhöhe des PDGF-BB in den AFM-Bildern. Es sind die Mittelwerte mit der dazugehörigen Standardabweichung angegeben.	137

Abkürzungsverzeichnis

°C	- Grad Celsius
Abb.	- Abbildung
Abs.	- Absorption
bzw.	- beziehungsweise
ca.	- circa
cm	- Zentimeter
d.h.	- das heißt
db	- Dezibel
DI	- deionisiertes Wasser
dm	- Dezimeter
<i>E.Coli</i>	- <i>Escherichia Coli</i>
et al.	- et alii
FIA	- Flussinjektionsanalyse
FPLC	- Fast Protein Liquid Chromatographie
g	- Gramm
Gew %	- Gewichtsprozent
GFP	- (Green) Grün Fluoreszenz Protein
Gl.	- Gleichung
GST	- Glutathion-S-Transferase
h	- Stunde
His	- Histidin
IL	- ionic liquids (ionische Flüssigkeiten)
IUPAC	- Internatinoal Union of Pure and Applied Chemistry
L	- Liter
Lsg.	- Lösung
m	- Meter
mg	- Milligramm
min	- Minute
mL	- Milliliter
mmol	- Millimol
mol	- Mol
Mw	- Messwert
ng	- Nanogramm
nm	- Nanometer
NWG	- Nachweisgrenze
OD	- Optische Dichte
PAGE	- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Abkürzungsverzeichnis

PC	- personal computer
PI	- Protease-Inhibitoren
pI	- isoelektrischer Punkt
rel.	- relativ
RT	- Raumtemperatur
s	- Sekunde
SDS	- Natriumdodecylsulfat
TEG	- Triethylenglykol
U	- Ultraschallgeschwindigkeit
u.a.	- unter anderem
URT	- Ultraschall-Resonanz-Technologie
usw.	- und so weiter
UV	- Ultraviolett
VE	- Voll entsalzt
Vgl.	- Vergleich
VIS	- Visible, sichtbarer Bereich des Lichtspektrums
Vol %	- Volumenprozent
z.B.	- zum Beispiel
ΔU	- Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit
μg	- Mikrogramm
μm	- Mikrometer

Kurzzusammenfassung

Biotechnologische Produkte erfreuen sich einer steigenden Nachfrage. Durch Optimierung des Upstreams und der Kultivierung ist es möglich große Mengen Produkt, respektive Proteine, für die Aufreinigung, das Downstreamprocessing, zur Verfügung zu stellen. Die Stabilität der final erhaltenen Proteine ist dabei das Maß für eine gelungene Aufreinigung. Um die Produktstabilität von Proteinen über die Aufreinigungsschritte verfolgen zu können, wird ein System benötigt, das in der Lage ist Unterschiede zwischen verschiedenen Faltungszuständen des Proteins zu erkennen. Zudem muss es unter den im Downstreamprocessing gegebenen Bedingungen arbeiten.

Ein solches System ist Ziel der hier vorgestellten Arbeit. Die Basis dazu bildet die Ultraschall-Resonator-Technologie (URT) von TF Instruments, Heidelberg. Das bestehende manuelle Messsystem wurde zu einem Online-Messaufbau „Proteinmonitor“ weiterentwickelt. Der Volumenstrom, das Temperaturverhalten und die Reproduzierbarkeit der Messdaten wurden untersucht und optimiert. Die Messtechnik beruht auf der sehr sensitiven Bestimmung der Ultraschallgeschwindigkeit. Damit ist sie in der Lage Veränderungen einer Proteinprobe (z.B. Faltung, Denaturierung, Aggregation) zu erkennen. Dazu wurden Messungen mit den Modellproteinen RNase A, α -Chymotrypsin und Lysozym durchgeführt. Die Nachweisgrenze der Proteine liegt dabei abhängig von der Proteingröße im Bereich von $\mu\text{mol/L}$. Das Ultraschallsignal wird nicht durch die optischen Eigenschaften der Probe beeinflusst. Der entwickelte Proteinmonitor bietet zudem eine nichtinvasive Messtechnik, die mit einem geringen Probenvolumen (0,2 mL) und Probenvolumenstrom ($\dot{V} = 400 \mu\text{L/min}$) und ohne Hilfsreagenzien arbeitet. Damit ist die Methode flexibel auf jegliches wässrige System anwendbar.

Die Arbeit stellt den Prototyp des Proteinmonitors vor. Am Beispiel von Aufreinigungsprozessen (Aufreinigung von Kartoffelprotein mittels Membranadsorbern), Realproben (Plated Derived Growth Factor, PDGF-BB) und der Untersuchung nicht wässriger Proben wird das weite Einsatzspektrum der Ultraschallgeschwindigkeitsanalyse vorgestellt. Zudem zeigt die vorgestellte Anwendung des URT-Systems als Feuchtigkeitsmesser von Triethylenglykol, dass die Messungen sich durch hohe Genauigkeit ($\sim 0,2 \%$) und Präzision ($> 0,5 \%$) auszeichnen.

Schlagwörter: Ultraschall, Downstream Analytik, Ultraschallgeschwindigkeit

Abstract

High purity and quality of products for medical applications lead to new challenges in analytics. Their production in biotechnological processes results in several steps defined as bottle necks especially in the downstream part because of a lack of applicable online analytics. Most well-established methods are based upon optical measurements. Since enrichment of target molecules is a major goal in the downstream part, optical methods are typically not suitable as online measurement systems for they require usually low concentrated samples.

A promising method to optimize downstream processing steps by online control is the use of ultrasonic waves. A main advantage of this noninvasive technique is that it is unaffected by any optical characteristics of the sample as e.g. clouding. Another advantage is the possibility to detect the protein folding status. During the downstream process the product, respectively the protein, is exposed to many changes in conditions. This can affect the stability of the protein conformation and thereby the yield. A basic system using the ultrasonic resonance technology, URT by TF Instruments (Heidelberg, Germany), was already successfully used in detecting protein folding offline. This system was modified and adapted for an on-line process monitor, the "Proteinmonitor".

The parameter of flow rate, temperature effects and reproducibility of the measurements were tested and optimized. The measuring cell contains a volume of 0.2 ml and measurements are typically carried out at a flow rate of 0.4 ml/min.

The basic concept is the high precise measurement of the ultrasonic velocity of the sample to get information of the current state of a downstream process. To express this, measurements with different model proteins (RNase A, α -chymotrypsine and Lysozyme) were done. The detection limit of these proteins is in the range of $\mu\text{mol/L}$.

The Proteinmonitor is presented as a tool for a broad range of applications already suitable to downstream processing steps (purification of potato proteins through membrane adsorption), real samples (Plated Derived Growth Factor, PDGF-BB) and the use for measuring non-liquid samples. In this case the URT was used as humidity sensor for triethylenglycol and showed its quality through high performance ($\sim 0,2\%$) and precision ($> 0,5\%$).

Keywords: ultrasonic, downstream analytics, ultrasonic velocity

1 Einleitung

Bei dem Begriff Ultraschall denken die meisten Menschen spontan an die ersten Aufnahmen eines ungeborenen Kindes ¹. Überraschend ist an wie vielen anderen Orten uns Ultraschall noch begegnet. Aus dem Tierreich ist Ultraschall, also Schall der über dem hörbaren Schallbereich des Menschen liegt, schon Kindern vertraut. Fledermäuse sind dabei ein sehr bekanntes Beispiel für den Einsatz von Ultraschall zur Orientierung. Sie haben das System sogar nahezu perfektioniert und so fliegen sie unfallfrei in völliger Dunkelheit zwischen den Zweigen von Bäumen hindurch und fangen in der Stunde bis zu 500 Insekten im Flug. In Abbildung 1 ist die Jagdtechnik einer Fledermaus gezeigt.

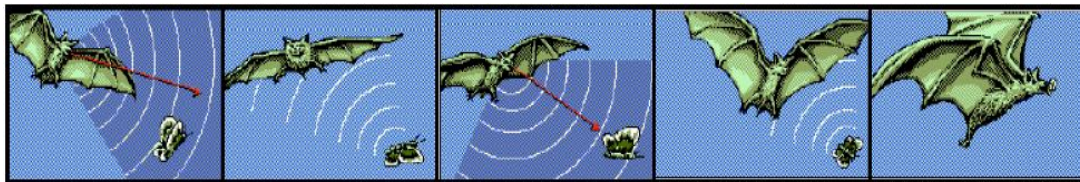


Abbildung 1: Die von der Fledermaus ausgesandten Ultraschallwellen werden vom Insekt reflektiert ².

Durch das Aussenden einer gebündelten Ultraschallwelle und die Auswertung des reflektierten Signals ergibt sich für die Fledermaus ein scharfes Bild ihrer Umgebung.

Aber auch Wale und Delphine nutzen Ultraschall. Wale nutzen sogar das ganze Schallspektrum aus, um zu kommunizieren. Der Walgesang ist dabei der bekannteste Vertreter der von Walen erzeugten Schallsignale. Wie bei den Fledermäusen kommt der Ultraschall bei ihnen zur Orientierung ins Spiel. Dazu nutzen einige Wale ein mit fettgefülltes Organ in ihrem Kopf, die Melone, um niederfrequente Klicks zu erzeugen. Als Empfänger dient ihnen eine fettgefüllte Aushöhlung des unteren Kieferknochens. Die Auswertung erfolgt in Sekundenbruchteilen. Ähnlich wie Fledermäuse sogar bei voller Fluggeschwindigkeit Drähten mit nur 1 mm Durchmesser ausweichen, sind Delphine in der Lage durch ihre Ultraschallpeilung Tricks wie Ringe aufsammeln auch mit verbundenen Augen durchzuführen ^{2, 3}. Durch diese Naturphänomene sind Forscher schon Ende des 18. Jahrhunderts auf die Idee gekommen, dass es mehr geben muss, als das was wir sehen und hören. Mit wenig zimmerlichen Tierversuchen kamen sie hinter das Geheimnis der Fledermäuse. Die gute Schallübertragung in Wasser beschrieb Leonardo da Vinci

sogar schon 1490. Auf dem Basiswissen über Ultraschall wurde schließlich Anfang des 20. Jahrhunderts der Schritt zum „sound-navigation and ranging“-System, dem SONAR vollbracht. Die Entwicklung eines Schallsenders, der das reflektierte Signal wieder auffangen konnte, um es auszuwerten, bildete den Beginn dieser Forschung. Damit war es möglich die bei den Tieren entdeckte Methode der Orientierung zu kopieren und auszubauen.

Heute gibt es eine Vielzahl von Ultraschallanwendungen, die uns täglich umgeben. Ultraschall wird, dem tierischen Vorbild folgend, klassisch für Abstandsmessungen, Füllhöhemessungen und zur Fehlstellenerkennung eingesetzt. In der Sicherheitstechnik werden Ultraschallsensoren z. B. in Alarmanlagen verwendet und auch das Auto ist nicht frei von Ultraschall. Parkhilfen, Fühler für die Messung der Sitzbesetzung, Ölqualitätsmessung, Niveaumessung von Benzin und anderen Flüssigkeiten sowie die unliebsame Geschwindigkeitsmessung gäbe es ohne Ultraschall nicht ⁴.

Es liegt nahe, eine so potente Technik auch im industriellen Bereich einzusetzen. Die erwähnten bildgebenden Techniken aus der Medizin sind auch in anderen, technischen Bereichen anwendbar. Genauso verhält es sich mit den messenden und erkennenden Anwendungen, die zumeist in der Automatisierungstechnik genutzt werden.

Eine feinere Nutzung des Ultraschalls als Messsignal für einen Sensor wird in der vorliegenden Arbeit vorgestellt. Das Ultraschall ein so differenziertes Bild der Umgebung liefern kann, liegt an der unterschiedlichen und Medium abhängigen Ausbreitung, die Schallwellen gemein ist. Die Zeit, die eine Schallwelle braucht um ein Medium, z. B. Wasser, zu durchqueren, hängt von dessen Zusammensetzung ab. In 25 °C warmem Meerwasser mit einem hohen Salzgehalt ist die Ultraschallwelle mit 1.531 m/s ⁵ bedeutend schneller, als z. B. in einem Süßwasserteich mit nur ~1.496 m/s ^{5, 6}. Um also Aufschluss über die Konzentration an gelösten Stoffen oder auch die Reinheit von Stoffen zu erhalten, wird die Bestimmung der Geschwindigkeit genutzt. Die Ultraschallgeschwindigkeit ist dabei für einen Stoff oder auch ein Stoffgemisch typisch. Durch die Messung kann damit auf die Reinheit und die Konzentration geschlossen werden. Das dieser Arbeit zugrundeliegende System begnügt sich dabei allerdings nicht mit einer Konzentrations- oder Reinheitsbestimmung. Die Entwicklung eines Sensorsystems, das in der Lage ist, online in der Bioprozesstechnik im Bereich des Downstreamprocessing angewandt zu werden, war das primäre Ziel. Dabei war vor allem die Aufarbeitung von Proteinen und deren Konformation Schwerpunkt der Arbeit.

2 Zielsetzung

In der Biotechnologie werden durch den dreiteiligen Prozess des Upstream, der Kultivierung und des Downstream, für die medizinische Anwendung bestimmte, hochwertige Produkte gewonnen. Die gentechnische Modifikation von Bakterien, tierischen und pflanzlichen Zellen und sogar Pilzen⁷, liefert ein breites Portfolio an produzierbaren Stoffen. Die Herstellung von so gewonnenen rekombinanten Proteinen liegt dabei im besonderen Interesse der vorliegenden Arbeit.

Proteine sind eins der häufigsten Produkte der Biotechnologie; sie werden z. B. als Therapeutika eingesetzt. Dadurch unterliegen sie besonders starken Kontrollen und müssen hohen Reinheitsansprüchen genügen. Die Abtrennung z. B. eines Enzyms von den Rückständen der Kultivierung, führt dabei oft zu kritischen Aufarbeitungsbedingungen für dieses. Enzyme besitzen in ihrer nativen Form ein aktives Zentrum, welches ihre therapeutische Wirkung gewährleistet. Je reiner das Zielenzym während der Aufreinigungsprozesskette vorliegt, umso anfälliger wird seine Struktur gegenüber Schädigungen. In der Natur sind Proteine allgemein üblicherweise von einem physiologischen, die Struktur stützenden Medium umgeben. Während des Downstreamprocessing werden im das Protein umgebenden Medium Wechsel, wie z. B. pH-Änderungen oder Erhöhung von Salzgradienten vollzogen. Dies dient der Aufreinigung des Proteins aus seiner Ursprungsmatrix. Diese Wechsel können allerdings auch wie beschrieben die Konformation des nativen Proteins gefährden. Bei einer irreversiblen Änderung der Proteinstruktur, wie z. B. der Fibrillenbildung des Enzyms Insulin⁸⁻¹², kann das Produkt nicht weiter verwendet werden. In Abbildung 2 ist dazu der strukturelle Unterschied einer nativen Probe Insulin (A) gegenüber einer fibrillenhaltigen (B) gezeigt.

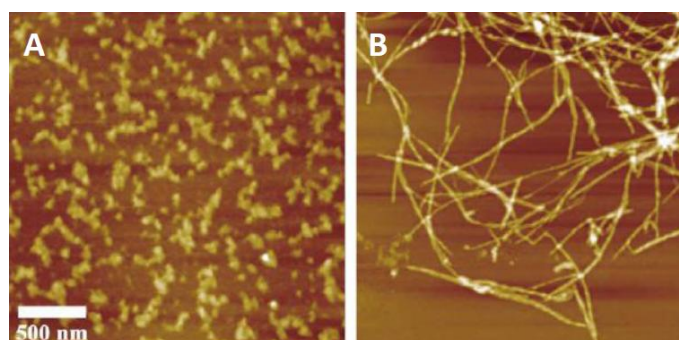


Abbildung 2: AFM-Aufnahmen (atomic force microscopy) der Fibrillenbildung bei Insulin. Bild A zeigt kleinere Aggregate des nativen, Bild B fibrillogenes Insulin ¹¹.

Die Kontrolle solcher Faltungsvorgänge während der Aufreinigung ist daher von großem Interesse. Durch fehlende Analytik ist es momentan nicht möglich, alle Bereiche zu kontrollieren, so dass es sogenannte „bottle necks“ gibt. Die Prozessschritte können ohne Kenntnis der genauen Prozessabläufe, auf Grund der fehlenden Messtechniken, nur schwer optimiert werden. Dieses macht das Downstreamprocessing zu einem zeitaufwändigen und kostenintensiven Prozessschritt. Zudem steigt mit der Anzahl der passierten Reinigungsschritte das Risiko, das Produkt zu schädigen. So kommt es durch die Aufreinigung pharmazeutisch inaktiv gewordener Proteine zu erheblichen ökonomischen Verlusten in der biotechnologischen Produktion. Daher ist der Aufarbeitungsbereich ein wichtiger Ansatzpunkt zur Optimierung. Die verbesserte Überwachung der Prozessschritte aufgrund neuer Messsysteme hat sowohl einen Einfluss auf die Ressourceneffizienz, als auch auf Qualität und Ausbeute der Produkte. Es wird ein Messsystem benötigt, das universell einsetzbar in allen Prozessschritten ist und in der Lage ist, online die Proteinfaltung zu messen. Abweichungen vom Signal des Zielproteins werden an eine Steuereinheit weitergeleitet und der fehlerhafte Produktstrom wird verworfen. Dadurch können Fehlchargen vermieden werden.

Auf Basis der Ultraschall-Resonator-Technologie (URT) der Firma TF Instruments, Heidelberg, die bisher nur als statisches Gerät auf dem Markt erhältlich ist, soll ein entsprechendes Online-Messsystem entwickelt werden. Durch erste Versuche ist bekannt, dass diese Technik zur Beobachtung von Proteinfaltungsvorgängen geeignet ist¹². Um es produktionstechnisch nutzbar zu machen, soll das statische Gerät in ein Online-Durchflussmesssystem, den sogenannten „Proteinmonitor“ umgebaut werden. Dazu ist sowohl eine Anpassung der bestehenden Hardware, als auch der Software notwendig. Durch entsprechende Auswertelgorithmen soll ein automatisch agierendes Kontrollsystem entstehen. Für die Auslegung des Systems auf den Downstreamprocess ist daher eine Ermittlung der Kenndaten und des Messsystemverhaltens erforderlich. Dazu zählen Versuche mit typischen Lösungsbestandteilen des Downstreamprocessing ebenso wie die Adaption und Untersuchung an Modellproteinprozessen. Nach dem Aufbau eines Prototyps soll dieser daher bereits an Aufreinigungsprozessen im Labormaßstab getestet werden. Die Überwachung eines Zielproteins während der Aufreinigung und von Konformationsänderungen, sollen dabei Aufschluss über die Eignung und Robustheit des Proteinmonitors geben. Ein funktionsfähiger Proteinmonitor soll der Optimierung von Prozessschritten dienen und dabei flexibel auf die verschiedenen Aufreinigungsschritte angepasst sein.

3 Theoretischer Teil

Bei Schall handelt es sich um ein akustisches Signal, das als longitudinale Welle (Druckwelle) durch ein Fluid wandert. Dabei werden die Molekülabstände des Fluids komprimiert und gestreckt. Im Fluid entstehen so Zonen mit Überdruck (Druckspannung) und Unterdruck (Zugspannung). In Feststoffen treten zusätzlich Transversalwellen (Scherwellen) auf, die eine vertikale Bewegung der Teilchen zur eigentlichen longitudinalen Welle induzieren. Schall ist immer an eine Teilchenbewegung gekoppelt und sie wird damit von den stofflichen Eigenschaften des Fluids beeinflusst. So steigt die Geschwindigkeit einer Schallwelle mit steigender Dichte des Fluids und sinkt im Gegensatz mit steigender Kompressibilität¹³⁻¹⁶.

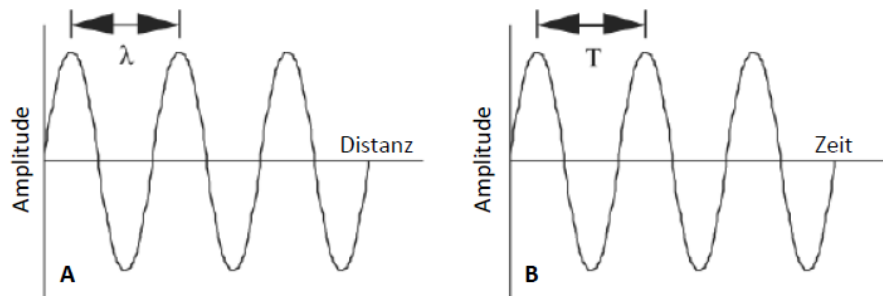


Abbildung 3: Darstellung der Wellenlänge (λ) links und rechts der Periodendauer (T) einer harmonischen Schwingung¹⁵.

Die Frequenz (f) ist charakteristisch für den Schall und wird in Hertz (Hz) angegeben. Ihre Amplitude beschreibt die maximale Auslenkung. Die Wellenlänge (λ) beschreibt den örtlichen Verlauf der Amplitude und ist mit der Frequenz über die Schallgeschwindigkeit (c) verbunden nach Gleichung 1.

$$c = \lambda \cdot f \quad (1)$$

Die Schwingungsdauer (T) ist mit der Frequenz reziprok verbunden über Gleichung 2. Sie beschreibt die zeitlich periodische Wiederholung einer harmonischen Schwingung. Wie in Abbildung 3 gezeigt, gibt die Schwingungsdauer die Dauer einer Periode an¹⁵.

$$f = 1/T \quad (2)$$

Der Schall teilt sich in die verschiedenen Frequenzbereiche: Infraschall, Hörschall, Ultraschall und Hyperschall. Der Abbildung 4 entsprechend ist Infraschall Schall mit einer Frequenz die kleiner als 20 Hz ist und für den Menschen als niederfrequenter Schall somit nicht hörbar ist. Der Hörschall beginnt ab 20 Hz und geht bis 20 kHz.

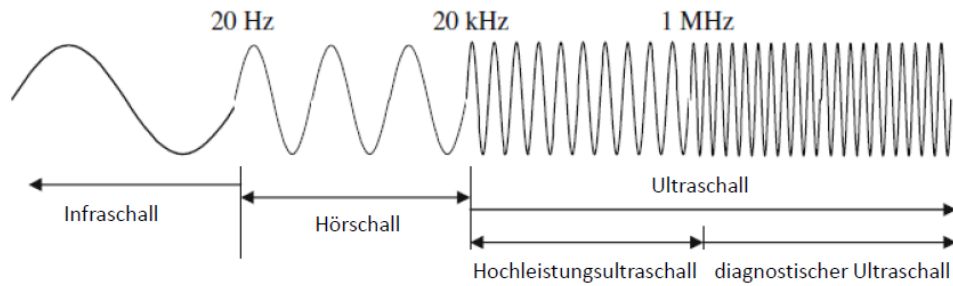


Abbildung 4: Diagramm des Schallspektrums ¹⁴.

Der Ultraschall ist mit 20 kHz bis 1,6 GHz zu hochfrequent für das menschliche Gehör. Der Ultraschall kann dabei noch in den Hochleistungsumschall (power ultrasonic) bis 1 MHz und den diagnostischen Ultraschall über 1 MHz unterteilt werden. Dieser hochfrequente Schall dient hauptsächlich den bildgebenden Anwendungen von Ultraschall in der Medizin oder der Sensortechnik. Mit Schallwellen über einer Frequenz von 1 GHz ist der Hyperschall nur noch bedingt ausbreitungsfähig und soll hier nur aufgrund der Vollständigkeit genannt sein. Die Ausbreitungsfähigkeit ist von Interesse, da allgemein gilt, dass je höher die Schallfrequenz ist, desto stärker wird der Schall vom durchwanderten Fluid absorbiert. Für Ultraschall einer Frequenz von 220 kHz beispielsweise sinkt die Schallintensität des Impulses auf ein tausendstel des Ausgangswerts nach dem Passieren einer Strecke von einem Meter durch Luft ^{6, 14, 17}. Bei Gasen wird der Zusammenhang zwischen Ultraschallgeschwindigkeit u und der adiabatischen Schallabsorption $\left(\frac{dp}{d\rho}\right)_{ad}$ beschrieben durch Gleichung 3 ¹⁶.

$$u^2 = \left(\frac{dp}{d\rho}\right)_{ad} \quad (3)$$

Die Absorption ist dabei gegeben durch die Änderung des Schalldrucks (p) des Ultraschallsignals mit der Änderung der Dichte (ρ) des Fluids. Typische Werte für die Ultraschallgeschwindigkeit sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Typische Werte für Ultraschallgeschwindigkeiten in verschiedenen Medien, nach ¹⁸.

Medium	Ultraschallgeschwindigkeit [m/s]
Vakuum	0
Luft	330
Flüssigkeiten	800 - 2.000
Wasser	1.500
Feststoffe	5.000 - 10.000

Die Grundlage der Ultraschalltechnologie bildet der piezoelektrische Effekt, der 1880 von den Brüdern Paul-Jacques und Pierre Curie entdeckt wurde. Er ermöglicht, durch bestimmte Materialien (z.B. α -Quarz), mechanische Kraft in elektrische umzuwandeln und umgekehrt. Per Definition ist dabei die Funktionsweise eines Signalwandlers (Transducer), elektrische Energie in mechanische umzuwandeln. Ein Receiver übersetzt mechanische in elektrische Energie ¹⁹. Ultraschall bietet sich durch die induzierbaren physikalischen und chemischen Effekte für verschiedene Anwendungsbereiche an. Das ursächliche Phänomen wird als Kavitation bezeichnet. Durch die Schallwelle werden, wie anfangs erwähnt, die Molekülabstände des Fluids komprimiert und gestreckt. Die Druckunterschiede zwischen den hohem Druck ausgesetzten komprimierten und den niedrigem Druck ausgesetzten gestreckten Bereichen verursacht die Kavitation. Wenn die Abstände zwischen den Molekülen durch den Unterdruck unter den Mindestabstand für ein stabiles Fluid sinken, bilden sich Kavitationsblasen (cavitation bubbles). Die Kavitations-Schwelle (Blake Schwelle) wird durch die Gleichung 4 beschrieben.

$$P_B = P_0 - P_v + \frac{4}{3} \sigma \sqrt{\frac{2\sigma}{3(P_0 + 2\frac{\sigma}{R_0} - P_v)R_0^3}} \quad (4)$$

Der niedrigste Schalldruck zur Erzeugung von Kavitationsblasen (P_B) ist über den Zusammenhang zwischen dem Dampfdruck des Fluids (P_v), der Oberflächenspannung (σ), dem Anfangsradius der Nanoblasen (R_0) und dem Systemdruck (P_0) gegeben. Schallwellen erreichen bei hohen Frequenzen bei heutigen Methoden nicht einen entsprechenden Schalldruck, so dass mit Kavitation nur im Frequenzbereich von unter 1 MHz gearbeitet wird ^{13-16, 20, 21}.

Dabei dominiert der Einfluss der physikalischen Eigenschaften der ultraschallinduzierten Kavitation in einem Frequenzbereich von 20-100 kHz. Die Blasenbildung kann im Rhythmus der Schallwelle im Gleichgewicht mit dem Blasenkolaps stehen. Die Wachstumsphase der Blase kann auch verlängert sein, so dass größere Blasen entstehen. Diese brechen entweder wieder auf ihre Ursprungsgröße zusammen oder wachsen bei höherem Schalldruck schneller und zerplatzen in viele kleinere Blasen. Durch das Zerplatzen dieser kleineren Blasen werden Turbulenzen auf Mikroebene des Fluids erzeugt, wie es in Abbildung 5 zu sehen ist.

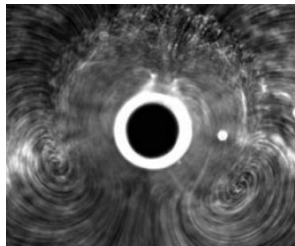


Abbildung 5: Mikroturbulenzen bei einer Frequenz von 11 kHz um eine 272 µm Radius grosse Kavitationsblase ¹⁴.

Beim Kollaps einer Blase kann sich ein Druck von 70-100 MPa aufbauen, der eine Schockwelle erzeugt. Die physikalischen Effekte sind besonders wirkungsvoll an Grenzflächen zu beobachten. Der Austausch von Wärme und Massen wird dabei besonders effektiv verbessert. Kann der erhöhte Druck beim symmetrischen Zerbersten schon Polymerketten und Zellwände aufbrechen, so verursacht das asymmetrische Kollabieren an Grenzflächen eine Abtragung von Grenzflächenmaterial. In Abbildung 6 ist das „microjetting“, die wie ein Strahl auf die Oberfläche gerichtete Kraftentladung beim Kollaps der Blase, schematisch dargestellt. Dieser Effekt wird zur Reinigung von Oberflächen oder zur Fragmentbildung genutzt ^{13, 14, 21, 22}.

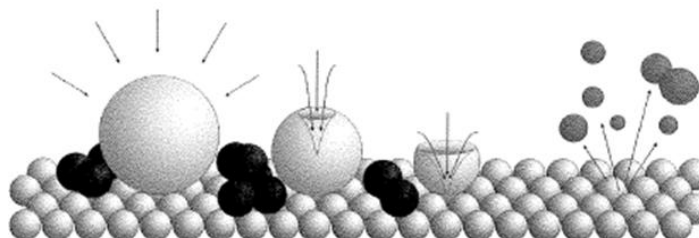


Abbildung 6: Asymmetrisches Kollabieren einer Kavitationsblase an einer Phasengrenze nach ¹⁴.

Die chemischen Effekte treten am stärksten im Frequenzbereich von 200-500 kHz auf. Die Sonochemie nutzt die Kavitationsblasen als kleine Chemiereaktoren. In ihnen herrscht erhöhter Druck und, mit steigender Frequenz, Temperaturen bis über 5.000 K. Ausgangspunkt für die auf den Kollaps folgenden chemischen Reaktionen ist die Radikalbildung in der Blase. Um die Ausbeute an Radikalen zu erhöhen, muss die Anzahl an aktiven Blasen maximiert werden, was im genannten Frequenzbereich der Fall ist. Die Temperatur der so gebildeten Blase kann durch Erhöhung des Schalldrucks, des externen Drucks oder Abkühlen des Fluids erfolgen. Somit werden Blasen zu aktiven Kavitationsblasen, in denen zunächst Primärradikale gebildet werden. Von diesen ausgehend können zahlreiche Kettenreaktionen gestartet werden. So können gezielt Blasen mit Hydroxylradikalen ($\text{OH}\cdot$) und sogar Peroxylradikale ($\text{HO}_2\cdot$) generiert werden. Dadurch gelang der Zugang zu mit Gas und Flüssigkeit gefüllten Proteinmikrosphären, die als Arzneimittel Anwendung finden. Die Effekte der Sonochemie werden auch genutzt, um im Bereich der Ökologie Wasser, Luft und Böden von Verunreinigungen zu befreien. Dabei können sowohl chemische als auch biologische Verunreinigungen entfernt werden. In Konkurrenz zur Kavitation durch Ultraschall, steht die hydrodynamisch ausgelöste Kavitation. In Abbildung 7 ist ein hydrodynamischer Kavitationsreaktor gezeigt, der den Effekt für Prozesse des Emulgierens, Homogenisierens und der Dispersion nutzt. Durch die Veränderung der Druckverhältnisse durch den Einbau einer Düse wird die dafür nötige Kavitation erzeugt.

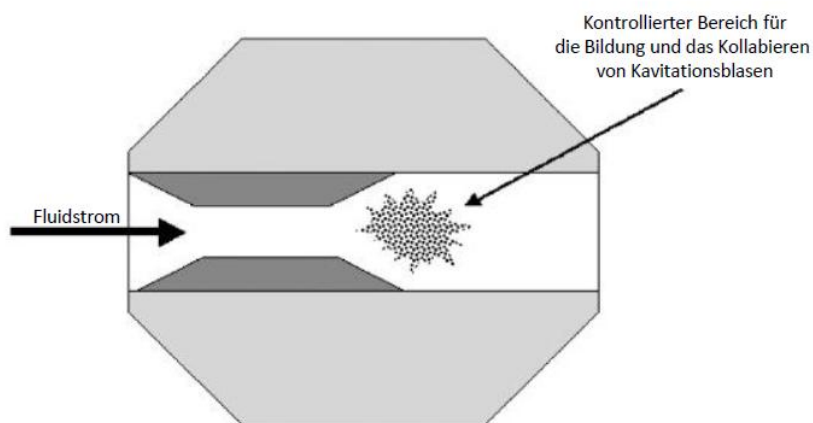


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Pfeifen-Reaktors zur hydrodynamischen Kavitationsblasenbildung ²³.

Abschließend zu diesem Frequenzbereich soll die chemische Erscheinung der Sonolumineszenz, die Lichtemission beim Kollaps der Kavitationsblasen, genannt sein^{14, 20, 23-27}.

Im Frequenzbereich über 1 MHz ist das sogenannte „acoustic streaming“, durch die Schallwellen induzierte Strömungserscheinungen, vorherrschend. Die Schallwelle induziert Bereiche von hohem und niedrigem Druck, während sie das Fluid passiert. Die Druckunterschiede sind dabei direkt proportional zum Energieeintrag ins System. Die Viskosität des Fluid führt zum viskosen Fluss. In Abhängigkeit vom ursprünglichen Ultraschallsignal und dessen Veränderungen durch Reflexion an Oberflächen bildet sich eine Flussrichtung aus. Hochfrequenter Ultraschall führt zu stärkerer Strömung als niederfrequenter Ultraschall der gleichen Intensität^{14, 28, 29}. Die beschriebenen Effekte der verschiedenen Frequenzbereiche stehen jeweils nur für die in diesen Bereichen dominierenden Erscheinungen. Alle Effekte treten bei allen Frequenzbereichen auf, sie sind lediglich schwächer oder entsprechend stärker ausgeprägt.

Diesen sehr direkten Einsatzfeldern von Ultraschall ist die Verwendung von Ultraschall als Bestandteil von Sensoren gegenübergestellt. Die hier für den Ultraschall geltenden Vorteile einer nicht invasiven Technik, mit schnellem Antwortsignal, einer hohen Auflösung und Genauigkeit zeigen ein anderes Bild.

Der Frequenzbereich, in dem diese Ultraschallsensoren arbeiten, liegt dabei zwischen 20 kHz und 10 MHz³⁰. Der Schalldruck wird dabei so gewählt, dass es nicht zu den beschriebenen Kavitationseffekten kommt. Die wohl bekanntesten Vertreter von Ultraschallsensoren sind in der Medizin zu finden. Ultraschall dient hier der Visualisierung. Der erste so genannte B-mode (brightness mode) Ultraschallbildgeber für klinische Anwendungen wurde bereits 1951 von Dr. John J. Wild entwickelt. John Reid, ein Ingenieur, baute mit Dr. Wild im Jahre 1951 erstmalig einen tragbaren B-mode Scanner. Weiter verbreitet waren allerdings bis in die 1970er Jahre die mit einem statischen Arm oder Wasserbad arbeitenden Geräte. Allen Scannern war die Erzeugung eines grauabgestuften Bildes aus der Amplitude des Antwortsignals auf das Ultraschallsignal gemein. In den späten 70er Jahren gelang durch neue Elektronik die Weiterentwicklung zu Handgeräten, die schließlich auch Echtzeitaufnahmen ermöglichten. Seit den 80er Jahren ist weiterhin die farbige Darstellung von Strömungen durch Ultraschall Bilderzeugungssysteme möglich.

Ultraschallwellen können auch in der Medizin Bestandteil der eigentlichen Therapie sein. Das Zertrümmern von Nierensteinen zählt zu den bekannten Anwendungen. Jüngste Untersuchungen der TU Wien in Zusammenarbeit mit dem AKH Wien belegen, dass Ultraschall beim Auflösen von Thromben unterstützend wirkt. Durch seine Effekte kann Ultraschall aber auch schädigend auf den menschlichen Körper wirken. Schon 1917 berichtete Langevin: “Fish placed in the beam in the neighborhood of the source operation in a small tank were killed immediately, and certain observers experienced a painful sensation on plunging the hand in this region.”, übernommen aus ¹⁵ ursprünglich aus ³¹. Daher werden in der Ultraschalldosimetrie die Einflüsse des Ultraschalls auf biologisches Material genau untersucht ^{2, 4, 15, 19, 32-41}.

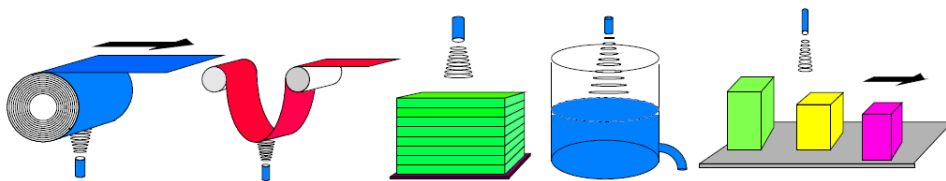


Abbildung 8: Schematisch gezeigt sind von links nach rechts die Durchmessererfassung, Durchhangregelung, Höhenmessung, Füllstandsmessung und das Erfassen von Objekten, bzw. Fehlstellen, in der Automatisierungstechnik ¹⁷.

In der Industrie haben die Ultraschallmessgeräte einen festen Platz im Bereich der Automatisierungstechnik (Abbildung 8) und der zerstörungsfreien Materialprüfung. Eine ausgesandte Ultraschallwelle reagiert unabhängig von Material, Farbe und den Lichtverhältnissen auf einen Gegenstand. Dabei ist es sogar möglich, im Falle von gasförmigen Fluiden, die Welle durch Rauch oder Staub zu schicken ³⁰. Bei der Materialprüfung werden die Bereiche der Fehlersuche und Qualitätskontrolle von Ultraschallsensoren abgedeckt. Schon 1953 wurden die Vorteile, Werkstücke mittels Ultraschall auf Ihre Eigenschaften zu untersuchen, erkannt. Keramiken wurden z. B. vorher üblicherweise durch die Fuchsin-Probe auf ihre Dichte, bzw. Saugfähigkeit untersucht. Durch Einfärben konnten die Stücke danach nicht weiter verwendet werden. Die Ultraschallanalyse führte mit einer vergleichbaren Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens jedoch nicht zur Zerstörung des Werkstücks ^{4, 42-52}.

Die Grundfunktionsweise der Ultraschallsensoren beruht auf dem Aussenden eines akustischen Signals. Dieses wird wieder aufgefangen, nachdem es Kontakt mit dem Prüfbereich hatte und somit Informationen über diesen enthält. Diese Informationen können nun dem Signal entnommen werden³⁰. Die verschiedenen Wege der Signalgewinnung sind in Abbildung 9 gezeigt. Die präsentierten Methoden können in zwei Kategorien unterteilt werden. Bei der einen erzeugt ein Transducer aktiv eine Ultraschallwelle, die letztlich wieder durch den Receiver aufgefangen wird. Bis auf die unter (5) gezeigte, gehören alle dargestellten Messanordnungen dieser Kategorie an. Die in (5) vorgestellte Variante arbeitet nicht mit einem Transducer, der eine akustische Welle erzeugt. Es ist lediglich ein Receiver vorhanden, der die vom untersuchten Prozess erzeugten Ultraschallwellen detektiert.

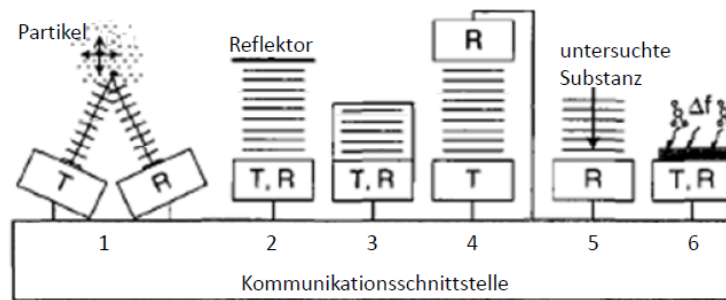


Abbildung 9: Mögliche Transducer (T) und Receiver (R) Anordnungen für Ultraschallmesssysteme. Abbildung nach Quelle³⁰.

Dieser Aktiv- und Passiv-Kategorisierung werden, der Abbildung folgend, noch weitere Unterscheidungen der aktiven Methoden vorgenommen. In (1) bis (3) kommt es durch die Reflexion an Partikeln (1), einem Reflektor (2) oder auch der untersuchten Substanz (3) zu Änderungen des Ultraschallsignals. Der Einfluss auf die Phase der Schallwelle, aber auch ihre Frequenz und Amplitude, enthalten die Informationen über den untersuchten Bereich. Im Fall des Aufbaus 1 lässt sich sogar durch die Ausnutzung des Dopplereffekts die Bewegung von Teilchen bestimmen. Bei der Transmission (4) ändern sich in Abhängigkeit von der Probe zwischen Transducer und Receiver die Phase und Amplitude der Schallwelle. Auf diese Art der Messanordnung wird später bei der Ultraschall-Resonator-Technologie (URT, von TF Instruments, Heidelberg) eingegangen. Bei der Emissionsmessung (5) enthalten die Amplitude und Frequenz des Ultraschallsignals generelle Informationen über den gesamten laufenden Prozess. Dieser kann somit

durch einen Sensor überwacht werden. Es ist dadurch aber aufwändiger diese Signale auszuwerten, da ein hohes Maß an Prozesskenntnis erforderlich ist. Akustische Mikrosensoren arbeiten hingegen dicht an der Transducer-/Resonator-Oberfläche. Die Resonanzfrequenz (6) der Ultraschallwelle und ihre Amplitude werden durch die Interaktion von untersuchtem Fluid und dessen Bestandteilen mit der Transducer-/Resonator-Oberfläche verändert. Die Beschichtungen der Oberfläche können dabei, je nach zu untersuchendem Prozess, variieren. In Tabelle 2 sind die verschiedenen Sensormethoden und die damit möglichen Analysen übersichtlich zusammengefasst.

Tabelle 2: Ultraschallsensoren und ihre Methoden nach ³⁰.

Methoden	Parameter	Anwendungsbereiche
Reflexion	Phase	- Abstands-, Füllstand-, Positions-, Ultraschallgeschwindigkeitsmessung
	Frequenz	- Objekterkennung und Struktur
	Amplitude	- Dichte-, Viskositäts-, Konzentrationsbestimmung - Bewegungs-, Geschwindigkeitsmessung
Transmission	Phase	- Konzentrationsmessung bei Mehrkomponentensystemen
	Amplitude	- Bestimmung der Partikel Größenverteilung in Suspensionen und Emulsionen
		- Volumen-, Massenstrombestimmung - Dichte-, Viskositätsmessung - Temperaturmessung
Emission	Amplitude	- Prozessüberwachung
	Frequenz	
Resonanz	Frequenz	- Massenbestimmung
	Amplitude	- Viskositäts-, Viskoelastizitäts-, Dichtemessung - gezielte Untersuchung chemischer oder biologischer Stoffe
		- Multikomponentenanalyse

Obwohl es möglich ist, mittels des Ultraschalls die Temperatur zu messen, gilt die Temperaturmessung nicht als verbreitetes Anwendungsgebiet. Von größerem Interesse sind die schon unter Automatisierungstechnik genannten Anwendungen in der Niveau- und Abstandsmessung. Strömungs- und Durchflussmessungen sind so wie der Bereich der Prozessanalyse für die Prozesstechnik und damit auch die Biotechnologie bevorzugte Einsatzgebiete. Zwar werden auch die Niveau- und

Abstandsmessung in der Prozesstechnik verwendet, es soll an dieser Stelle aber lediglich auf den Unterschied zwischen den Anforderungen der Prozesstechnik-anwendungen und der Automatisierungsanlagen eingegangen werden. Im Automatisierungsbereich reicht es durch eine Vergleichsschaltung die Änderung der Ankunftszeit des Schallsignals zu messen. Daraus wird die gewünschte Information über Füllstand, Abstand oder Fehlstellen erhalten. Für die Anwendungen in der Prozesstechnik sind die Techniken abwechslungsreicher. So gibt es präzise Methoden zur abtastenden akustischen Mikroskopie (scanning acoustic microscopy). Höhere Anforderungen werden noch an Füllstandsmesser in Anlagen gestellt und erfüllt. Intelligente Ultraschallsensoren sind dabei in der Lage, einzelne Echos aus einem Echoprofil zuzuordnen⁵³⁻⁵⁸.

Strömungs- und Durchflussmesser werden durch den technischen Fortschritt immer leistungsfähiger. Dazu kommt, dass es mittlerweile durch Datensammlungen einen breiten Zugang zu Materialparametern gibt, die für die Auswertung der komplexen Messsignale notwendig sind. Strömungssensoren, die auf Doppler- oder Laufzeitverfahren beruhen, sind dabei die gängigsten (Abbildung 10). Beim Laufzeitverfahren ist es möglich, die Strömungsgeschwindigkeit direkt zu bestimmen.

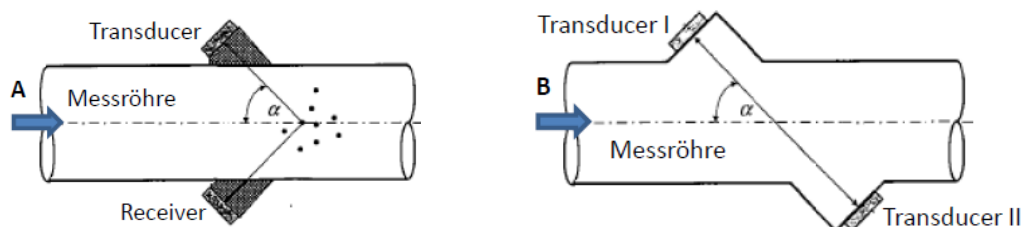


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der Ultraschallströmungsmesser nach Doppler- (A) und Laufzeitverfahren (B) nach³⁰.

Beim Dopplerverfahren geschieht dies indirekt. Durch den Dopplereffekt kommt es zu einer Änderung in der Frequenz (f). Je nachdem, ob Sender oder Empfänger ruhen, kommt es zu unterschiedlichen Effekten im Messsignal. Insgesamt sind drei Fälle der Messanordnung denkbar. So werden die beiden Fälle unterschieden, dass sich entweder der Schallsender oder der Schallempfänger mit dem Medium bewegen und der jeweils andere ruht. Der Unterschied in den erhaltenen Schallfrequenzen ergibt sich im Fall des ruhenden Empfängers durch die Berücksichtigung des strömenden Mediums. Beim ruhenden Sender hat es keinen Einfluss. Dazu kommt

der dritte Fall, bei dem es durch eine relative Bewegung von Sender und Empfänger zueinander zu einer Verschiebung der Sendefrequenz nach f' kommt. Die Doppler-Strömungssensoren arbeiten dementsprechend in der Praxis mit unbeweglichem Sender und Empfänger, wie in Abbildung 10 zu sehen. Die im Fluid gelösten Komponenten werden als Reflektoren für die Ultraschallwelle benutzt. Für die Frequenzänderung (Δf), der Sendefrequenz (f_0), gilt Gleichung 5, wenn für die Geschwindigkeit des Reflektors (v) $v \ll c$ erfüllt ist.

$$\Delta f \approx 2f_0 \frac{v}{c} \quad (5)$$

Durch eine Erhöhung der Sendefrequenz kann somit die Auflösung der Methode gesteigert werden. Kleinere Reflektoren werden im Signal sichtbar. Das Dopplerverfahren bietet sich dabei besonders für dämpfungsarme, aber streuintensive Medien an. Das in Abbildung 10 ebenfalls gezeigte Laufzeitverfahren ist dagegen besonders geeignet für dämpfungs- und streuungsarme Medien. Ein großer Vorteil der zum Impulslaufzeitverfahren zählenden Methoden ist die lineare Kennlinie und der große Messbereich. Dieser kann mit einer guten Auflösung, kleinen Messzeiten und einem Fehler von $< 1\%$ abgedeckt werden. Dabei sind die Ergebnisse weitgehend unabhängig von Druck, Temperatur, Dichte und Art des Fluids. Allerdings ist eine fest abgesteckte Messstrecke notwendig. Dazu kommt ein hoher elektronischer Stabilisierungsaufwand und die mögliche Beeinträchtigung des Messprozesses durch Streuphasen im Fluid. Im Vergleich dazu wird beim Dopplerverfahren mit offener Messstrecke gearbeitet. Es kann daher in sonst schwer zugänglichen Strömungsfeldern eingesetzt werden. Durch das einstellbare Messvolumen, die Möglichkeit die Rückstreuung zu messen und Richtungs- und Ortsbestimmungen vorzunehmen, ist es sehr flexibel auf Problemstellungen anwendbar. Allerdings gestalten sich die Messspektren komplexer. Dadurch, dass es eine indirekte Strömungsmessung über die Reflexion ist, müssen Streuteilchen im Fluid enthalten sein. Dazu müssen diese, ohne Unterbrechung der Strömung folgend, im Fluid zu finden sein. Daraus ergibt sich ein Fehler von $> 2\%$. Auch die Messungen der Rückstreuung sind nur mit großer Unschärfe möglich. Dennoch lässt sich durch eine passende Wahl für jedes Fluid der richtige Ultraschall-Strömungsmesser finden. In Tabelle 3 sind die verschiedenen Strömungseffekte und die diese ausnutzenden Methoden zusammengefasst. Es muss berücksichtigt werden, dass zwischen offenen (Dopplereffekt) und festen Messstrecken (Ablenk-, Mitführ- und Dämpfungseffekt) für die Messung der Effekte

unterschieden wird. Dazu gibt es noch zwei Betriebsarten, den Dauerbetrieb, cw-Betrieb (continuous wave), und den Impulsbetrieb, p-Betrieb (pulse). Die akustische Durchflussmessung basiert auf den gezeigten Strömungsmessverfahren. Für reine, homogene Fluide kommt das Laufzeitverfahren, für streuintensive Fluide das Dopplerverfahren zur Anwendung^{16, 30, 59-61}.

Tabelle 3: Übersicht über akustische Strömungsmessverfahren, nach⁵⁹.

Effekt	cw-Betrieb	p-Betrieb
Ablenkeffekt	Strahlenablenkverfahren	
Mitführeffekt	- Phasendifferenzverfahren - Frequenzdifferenzmessverfahren bei konstanter Wellenlänge (LLL)	- Laufzeitdifferenzverfahren - Periodendauerdifferenzverfahren - Frequenzdifferenzverfahren - Impulsreflexionsverfahren (Pingpongverfahren)
Dopplereffekt	Dopplerverfahren (meist cw-Betrieb)	
Dämpfungseffekt	Korrelationsverfahren	

Ultraschallsensoren finden weite Anwendung als analytische Prozessüberwachung in der Lebensmittel- und der chemischen Industrie, wie in Tabelle 4 dargestellt^{58, 60, 62-73}.

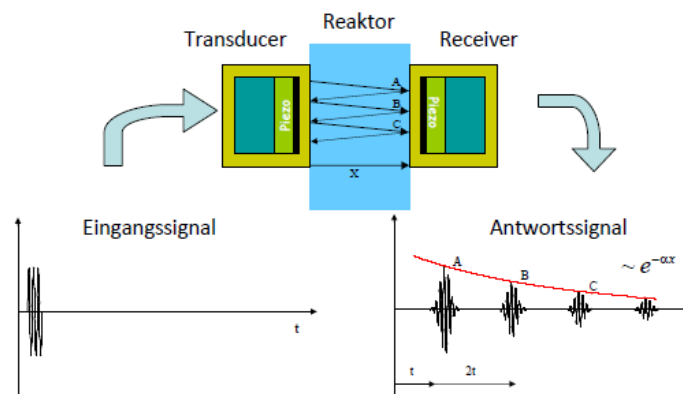


Abbildung 11: Schematische Darstellung der möglichen Messanordnung für Reaktorüberwachung, nach⁷⁴.

Im Bereich der Biotechnologie werden sie, wie gezeigt, für die Überwachung der Alkohol- oder Milchsäurefermentation und zur Bestimmung von Enzymkonzentrationen eingesetzt. Dabei ist hervorzuheben, dass sie online die Kultivierung

überwachen, ohne im direkten Kontakt zum Produkt zu stehen. Die Messung kann nichtinvasiv durch die Reaktorwand, wie in Abbildung 11 dargestellt, erfolgen. Gezeigt ist die Messung der Abschwächung des Ultraschallsignals über die Zeit, eine time-of-flight Analyse. Es ist möglich diese Sensoren als Einwegbauteil (disposable) einzusetzen. Durch z. B. die Verschärfung der GMP-Bedingungen werden Einweganwendungen in der Biotechnologie immer wichtiger^{74, 75}.

Tabelle 4: Ausgewählte Beispiele der Anwendungsbereiche für Ultraschallsensoren nach^{58, 67}.

Industriezweig	Bereich	Beispiel
Chemische Industrie	Polymerisation	Überwachung der Polymerisation und Materialrückführung
	Galvanische Prozesse	In-line Messung der Elektrolyt- und Säure-Konzentration
	Metallindustrie	Konzentrationsbestimmung von Rückständen in Lacken und Farben
	Primärindustrie	Messung von Salzkonzentrationen
	Abwasseraufbereitung	Überwachung der Abwasseraufbereitung
	Lackherstellung	Beobachtung von Kristallisation- oder Trennungsvorgängen
Lebensmittelindustrie	Getränkeindustrie	Konzentrationsverhältnisbestimmung in Bier oder Saft
	Stärkeproduktion	Untersuchung der Zusammensetzung von Stärkelösungen
	Margarineproduktion	Konzentrationsbestimmung
	Milchindustrie	Fettgehaltmessungen Untersuchung von Käse
	Biotechnologie	Milchsäurefermentationsüberwachung ^{76, 77} Enzymkonzentrationsbestimmung Verfolgung der Teigfermentation ⁷⁸ Konzentrationsbestimmungen bei alkoholischer Hefefermentation ⁷⁹⁻⁸¹

Die Vielfaltigkeit von Ultraschallapplikationen spiegelt sich insgesamt in ihrem Einsatz in der Biotechnologie wider. Die Bioprozesstechnik unterscheidet drei Prozessabschnitte: Upstream, Fermentation (inklusive Produktion) und Downstreamprocessing⁸². Im Upstream und während der Kultivierung, also der

eigentlichen Produktionsphase, stehen Zellen im Mittelpunkt des Interesses. Daher werden im Folgenden die möglichen Effekte von Ultraschall auf diese genauer betrachtet. Die auf die Zelle wirkenden Einflüsse des Ultraschalls können in physikalisch und chemisch unterschieden werden. Dabei lassen sich insgesamt, der Beschriftung in Abbildung 12 folgend, neun verschiedene Angriffspunkte für den Schall identifizieren.

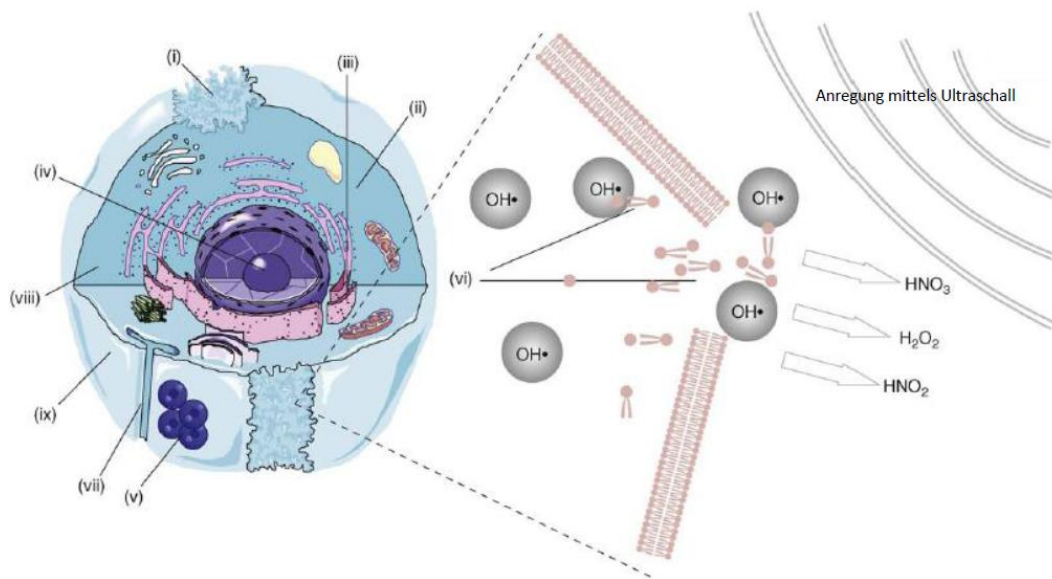


Abbildung 12: Interaktionsmöglichkeiten zwischen Ultraschallwellen und Zellen ⁸³.

Die Zelle (i) ist der Erwärmung, die durch den Energieeintrag der Ultraschallwelle ausgelöst wird, direkt ausgesetzt. So kommt es durch die Pyrolyse zur Verletzung der Zelle, was die partielle oder umfassende Zelllyse zur Folge haben kann. Der dominanter physikalische Effekt für die Zelllyse ist jedoch der durch die bereits beschriebene Kavitation und Scherkräfte, die zum Zelltod führen. Diese können auch die Ultrastruktur der Zelle (ii) verändern und die Enzymstabilität (iii) beeinflussen. Die Freisetzung von DNA durch den Bruch des Zellkerns (iv) ist ebenso möglich, wie der Bruch von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) (v). Weiterhin können die chemischen Effekte der Kavitation, die induzierte Radikalbildung, beobachtet werden.

Durch den radikalischen Angriff auf die Zelle werden Salpetersäure (HNO₃), salpetrige Säure (HNO₂) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) freigesetzt (vi). Dies verringert die Zellstabilität. Die Zelle ist aber nicht nur den genannten rein

physikalischen oder chemischen Effekten ausgesetzt. Das bereits beschriebene acoustic streaming kann die Zellmembran (vi) aufbrechen, den Massentransport durch die permeablere Membran erhöhen (viii) und sogar die Ladungen der Membranoberfläche (ix) verändern⁸³. In Abbildung 13 sind die Effekte in relativer Abhängigkeit zur Ultraschallintensität und Frequenz aufgeführt.



Abbildung 13: Der Ultraschalleinfluss auf Zellen, nach ²³.

Mit den beschriebenen Effekten auf Zellen und die Zellwand ergibt sich eine gängige Anwendung des Ultraschalls, der Zellaufschluss, als Schritt zum Downstreamprocessing⁷. Der gewünschte Bereich der Zellmembranschwächung wird, dem Schema folgend, durch Erhöhung der Ultraschallenergie und Erniedrigung der Frequenz erreicht. Mit $1-5 \text{ W/cm}^2$ arbeitet das in jedem Labor zu findende Ultraschallbad mit solch einem hohen Energieeintrag. Bei diesen kommt es zu Kavitation, die sowohl physikalische als auch chemische Reaktionen hervorrufen kann. Die Schallintensität im Bad ist allerdings nicht homogen und die Reproduzierbarkeit von Versuchen ist daher aufwändig. Eine die Kavitation dennoch ausnutzende Anwendung ist die Probenvorbereitung durch Entgasen und Homogenisieren. Es sind vereinzelt Ultraschallbäder kommerziell erhältlich, die wählbare Frequenz- und Schalldruckeinstellungen ermöglichen. Dazu sind die Bedingungen für homogene Schallverteilung, Distribution und Entgasen optimiert und einzeln verfügbar.

Ultraschallsonden sind im Vergleich dazu gezielter darauf ausgelegt, Ultraschall in ein Medium einzutragen. Die Schallintensität ist dabei bis zu hundertmal stärker als beim Bad. Die Steuerungstechnik für die Amplitude ist besonders darauf ausgelegt, dass die Kavitationseffekte möglichst kontrolliert und gezielt ablaufen können. Der generelle Aufbau ist in Abbildung 14 gezeigt.

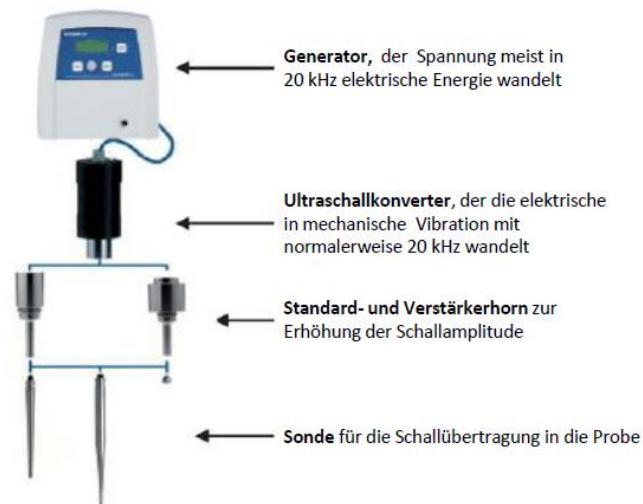


Abbildung 14: Schema der möglichen Varianten des Aufbaus von Ultraschallsonden, nach ⁸⁴.

Das Material und die Geometrie der Sonde können dabei variieren- aus Glas oder Metall, zylindrisch oder abgestuft. Sie finden klassischerweise Einsatz im Bereich der Elementen-Fest-Flüssigextraktion. Ultraschallbäder werden zur Extraktion von organischen Substanzen aus Feststoffen benutzt, da der Energieeintrag durch die Sonde schnell zu hoch sein kann. Die Schädigung des gewünschten Produkts ist dann die Folge. Durch den Einsatz von Ultraschallsonden ist es gelungen Reaktionen wie Enzymabbau oder sequentielle Extraktionen zu beschleunigen. Durch die Beschallung ist es möglich in nur 5 min eine Proteinprobe soweit in ihre Peptide aufzuspalten, dass eine Analyse mittels PMF (peptide mass fingerprint) zur Bestimmung möglich ist. In dieser Weise werden Ultraschallbad und -sonde gezielt zur Vorbereitung von Proben zur Analyse eingesetzt ^{13, 84}.

Der Effekt von Ultraschall kann weiterhin auf Enzyme nicht nur destruktiv sein. Schon 1963 wurde das Verhalten von Tryptophanase in *Escherichia coli* unter Beschallung untersucht. Zu diesem Zeitpunkt wurde Ultraschall meist eine chemische Wirkung durch Oxidation oder Reduktion attestiert. Heute sind neben den sonochemischen Effekten, die zur bereits beschriebenen Zerstörung der Proteinstruktur führen, auch wesentlich schonendere Eingriffe durch Ultraschall bekannt. Die Struktur von Enzymen kann durch schallinduzierte Strukturveränderungen Einfluss auf die Enzymaktivität nehmen. Die Haupteffekte sind dabei von Energieeintrag und Expositionsdauer abhängig. Der aktivierende oder auch

inaktivierende Einfluss auf Enzyme und dessen Nutzung wurde in der Literatur bereits ausführlich beschrieben^{14, 83, 85-117}.

Akustische Zellfilter werden in der Biotechnologie eingesetzt, um suspendierte Zellen in Perfusions-Bioreaktoren abzuscheiden. Der dabei genutzte Effekt, dass sich Teilchen in der Knotenebene sammeln, wurde bereits 1873 von Kundt und Lehmann entdeckt. Damals nutzten sie dies, um Ultraschallwellen sichtbar zu machen, wie es auch in Abbildung 15 am Beispiel von Pyrex-Glaskügelchen gezeigt ist. Die Partikel haben einen Durchmesser von 0,1 mm. Der Abstand der Teilchen-Agglomerate beträgt eine halbe Wellenlänge ($\lambda/2 = 1,1$ mm).

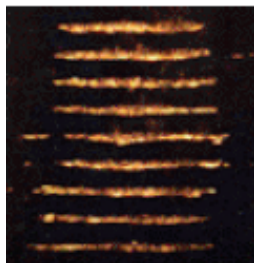


Abbildung 15: Foto von Pyrex Glaskügelchen in einem stehenden Ultraschallfeld bei einer Anregungsfrequenz von 670 kHz².

Verantwortlich für diese Beobachtung ist die Ausbildung einer stehenden Welle. Durch die Reflexion an der Oberfläche eines Feststoffs oder an einer Gas-Flüssigkeits-Grenzfläche und dem gleichzeitigen Erzeugen einer Welle kann es zu diesen Wellenmustern kommen. In Abbildung 16 ist der Effekt der stehenden Welle auf Gasblasen dargestellt.

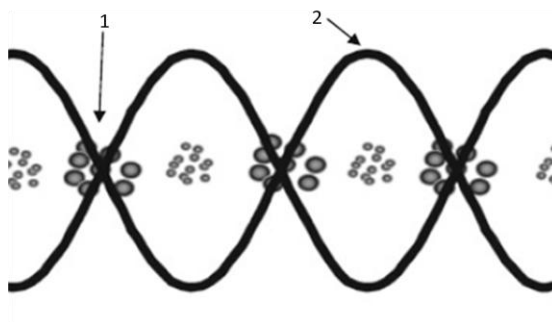


Abbildung 16: Schema des Effekts einer stehenden Welle auf Teilchen, hier Blasen, nach¹⁴. Die Blasen sammeln sich je nach Größe in den Knotenpunkten (1) oder Antiknotenpunkten (2).

Dem Effekt der Bjerkneskraft folgend sammeln sich große Teilchen in den Knotenpunkten (1) und kleine Teilchen zwischen den Maxi-/Minima, Antiknotenpunkten, der Welle (2). Die Unterscheidung in Groß und Klein ist dabei relativ zur Resonanz zu sehen^{22, 118}. Dieser Effekt wird in den Zellfiltern genutzt, um einen kontinuierlichen Erntestrom zu ermöglichen.

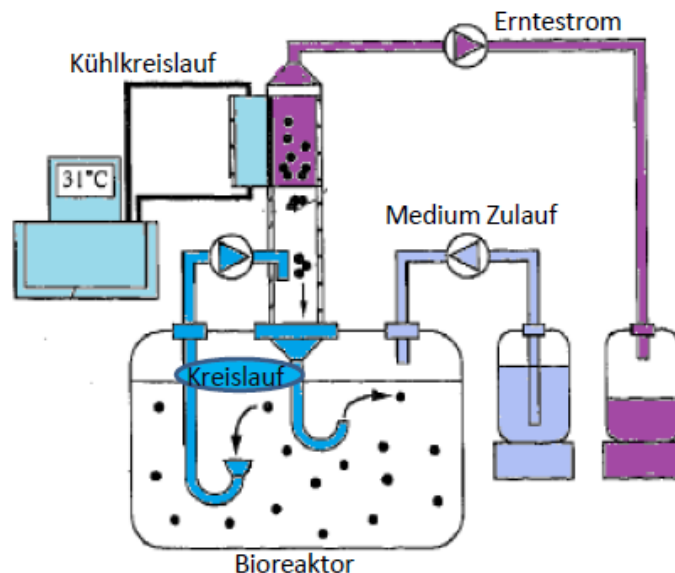


Abbildung 17: Schematischer Aufbau eines Bioreaktors mit akustischem Zellfilter, nach¹¹⁹.

In Abbildung 17 ist der schematische Aufbau eines solchen Reaktorsystems gezeigt. Der Reaktor wird durch einen Zulauf mit frischem Medium versorgt, während durch den Erntestrom verbrauchtes Medium mit z. B. extrazellulär produziertem Protein entnommen werden kann. Diese Methode wurde hauptsächlich darauf ausgelegt und getestet, das Wachstum von Zellen im Reaktor zu verbessern. Die Reaktorzelllösung wird im Kreislauf geführt, wobei durch ein höheres Pumpvolumen des Kreislaufs gegenüber dem Erntestrom ein Großteil des Mediums wieder zurück in den Reaktor gelangt. Der Erntestrom wird durch den Zellfilter geleitet, in dem, durch die Aggregatbildung der Zellen in den Knotenpunkten, die Zellen dem Strom entzogen und dem Rückstrom in den Reaktor zugeführt werden. Ein entscheidender Vorteil dieser Strategie ist, dass lebende Zellen der Ultraschallwelle einen größeren Schallwiderstand bieten als tote Zellen oder Zelltrümmer. Daraus ergibt sich eine angelegte Selektivität für das Herausfiltern lebender Zellen. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse einer Kultivierung dargestellt. Sie verdeutlicht das Potential dieser Technik beispielhaft.

Tabelle 5: Vergleich zweier Kultivierungen von menschlichen Hybridoma-Zellen im Perfusionsreaktor. Der Volumenstrom [l/d] wurde berechnet über den Eintrag von Medium in den Reaktor, bezogen auf die Fermentationszeit und das Fermentationsvolumen. Der tägliche Volumenstrom [L] wurde aus dem Produkt von Volumenstrom und Fermentationsvolumen erhalten, nach ¹¹⁹.

Parameter	ohne Zellfilter	mit Zellfilter
Fermentationsvolumen [L]	6	5,25
Max. Gesamtzellkonzentration im Reaktor [Zellen/mL]	$9 \cdot 10^5$	$9,6 \cdot 10^6$
Max. Konzentration an lebenden Zellen [Zellen/mL]	$6 \cdot 10^5$	$8,7 \cdot 10^6$
Max. Volumenstrom [l/d]	0,317	5,43
Max. täglicher Volumenstrom [L]	1,9	28,5
Max. tägliche Ernte [mg/L]	1,7	25,4

Durch den Eintrag von Energie ins Medium über die Schallwellen kommt es zu einer Temperaturerhöhung. Daher ist zur Stabilisierung der Temperatur ein separater Kühlkreislauf an den Filterraum angeschlossen. Ein Vorteil dieser Art von Filteraufbau ist die Vermeidung von Verklumpung oder Verstopfung. Die Zellen werden mit dem Medium dem Reaktor wieder zugeführt und solubilisiert ^{2, 14, 119-124}. Tabelle 6 enthält eine Zusammenstellung der genannten Ultraschalltechnologien und ihrer Anwendungen in der Biotechnologie.

Tabelle 6: Überblick der Ultraschallanwendungen in der Biotechnologie.

Gerät	Anwendung
Ultraschallbad	Homogenisieren, Dispergieren, Emulgieren
Aerosolbildung	Nebelreaktor
Akustischer Zellfilter	Ernte, Zellzurückführung
Biosensoren	Kultivierungsüberwachung Strömungs-, Durchflussmessung Füllstandmessung (Schaumbildung) (siehe Tabelle 2)
Ultraschallsonde	Zellaufschluss
Ultraschall-Resonator-Technologie (URT)	Beobachtung der Proteinfaltung

Die in der Tabelle 6 zuletzt aufgeführte UR-Technologie (TF Instruments, Heidelberg) ist das zentrale Forschungsprojekt dieser Arbeit. Daher soll es an dieser Stelle nur in Grundzügen vorgestellt werden.

Die in Abbildung 18 gezeigte Messzelle besteht aus einer Ultraschallzelle aus Titan (Ti), in die zwei Messkammern einer definierten Länge D gefräst wurden. In der Abbildung sind lotrecht von diesen Kammern abgehende Öffnungen gezeigt, die der Probenzufuhr dienen. Die Enden der Kammern sind an beiden Seiten mit goldbeschichtetem Lithiumniobat (LiNbO_3) (in der Abbildung mit Transducer bzw. Elektrode beschriftet) verschlossen. Die fertige Zelle, umschlossen von einem Rahmen, ist im rechten Teil des Bildes zu sehen.

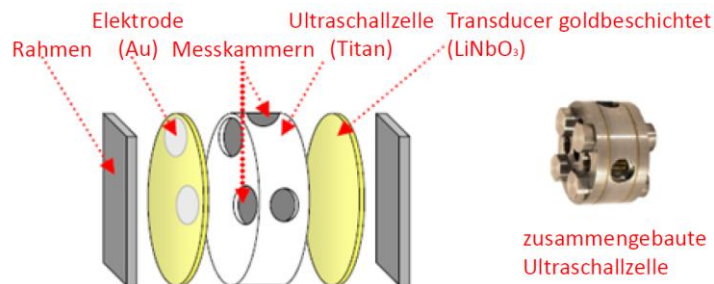


Abbildung 18: Aufbau einer URT-Resonatorzelle, nach ¹²⁵.

Die UR-Technologie nutzt die Resonanz zur präzisen Ultraschallgeschwindigkeitsbestimmung. Die Kammerlänge D von Transducer zu Elektrode ist bekannt. Durch das Ausbilden einer stehenden Welle über diese definierte Strecke (Abbildung 19) kann die Ultraschallgeschwindigkeit bestimmt werden. In einem idealen System ist die Resonanzbedingung für jede Welle, die bidirektional diesen Raum durchwandert, erfüllt, wenn für sie die Gleichung 6 mit dem ganzzahligen n gilt.

$$n\lambda = 2D \quad (6)$$

Die Wellenlänge λ bietet Zugang zur Geschwindigkeit u über die Frequenz f . Da gilt, dass $\lambda \cdot f = u$ ist und somit der Zusammenhang $f_0 = u/2D$ mit der Frequenz ($n \cdot f_0$) aufgelöst werden kann für jedes ganzzahlige Vielfache der Grundfrequenz f_0 . Die harmonische Ordnung ist dabei durch n gegeben.

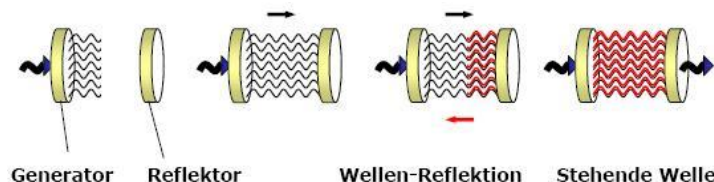


Abbildung 19: Prinzip des Aufbaus einer stehenden Welle in der URT-Messzelle, nach ¹²⁵.

Die beschriebene stehende Welle bildet sich nur unter bestimmten Resonanzbedingungen aus. Weiterhin ist für den Erhalt der Welle ein kontinuierlicher Energieeintrag in das System notwendig, wie es Abbildung 19 zeigt. Das Messsystem verhält sich, durch die Kopplungen zwischen dem Fluid in der Kammer und dem Elektrodenmaterial, nicht ideal. Durch das anharmonische Verhalten ist die direkte Bestimmung der Grundfrequenz f_0 unmöglich. Daher wird ein spezielles Verfahren nach F. Eggers verwandt, bei dem aus mindestens zehn Resonanzfrequenzen mit einer harmonischen Ordnung von ca. 70 die Grundfrequenz berechnet wird¹²⁶. Auf diese Weise wird das System für die Messungen kalibriert und bei gleichbleibendem Volumenstrom muss nur eine Resonanzfrequenz für die Geschwindigkeitsbestimmung gemessen werden.

Die Ultraschall-Resonator-Technologie (URT) wurde bereits für die Beobachtung von nanopartikularen pharmazeutischen Trägern¹²⁷ und Proteinfaltungsvorgängen¹² erfolgreich eingesetzt. Besonders auf den Erfahrungen mit Proteinen und dem sich dadurch ergebenden Potential für das Downstreamprocessing, liegt der Fokus dieser Arbeit.

4 Praktischer Teil

Das vorgestellte System ist in der Lage durch genaue Bestimmung der Ultraschallgeschwindigkeit in einem Medium Auskunft über Proteinfaltungsvorgänge zu geben. Um ein Signal, das lediglich eine Geschwindigkeit beinhaltet, deuten zu können, müssen die Randbedingungen möglichst genau festgelegt sein. Im Downstreamprocessing sind die Parameter der einzelnen Prozessschritte bekannt und das Zielprotein liegt bereits in einer hohen Konzentration und Reinheit vor. Das Protein ist während der Aufreinigung vielen Änderungen der Umgebungsbedingungen in pH-Wert, Salzkonzentration und anderer Cosolventien ausgesetzt. In Abbildung 20 sind dazu beispielhaft Stationen eines Aufarbeitungsprozesses aufgeführt.

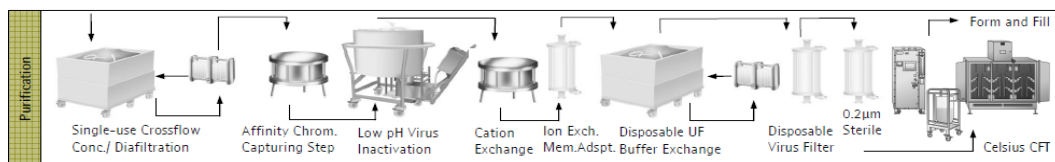


Abbildung 20: Beispiel verschiedener unit operations eines Aufreinigungsprozesses ¹²⁸.

In der Praxis gibt es für die Proteinestabilität kritische Prozessschritte. Aufgrund fehlender Analytik ist eine Prozesskontrolle dieser Schritte erschwert. Die Möglichkeit die Proteinkonformation mittels Ultraschall online zu überwachen, soll dazu dienen Aufreinigungsschritte zu optimieren und „bottle necks“ zu vermeiden.

4.1 Die Entwicklung des Messgerätes

Das Grundsystem der UR-Technologie von TF-Instrument, Heidelberg, wurde für Arbeiten bereitgestellt. Zu den in Abbildung 21 gezeigten Temperiereinheiten (A) und dem die Messzellen enthaltenden Messblock (B), gehört eine zusätzliche Reinigungseinheit. Bei diesem System sind Proben manuell einzufüllen und wieder zu entnehmen. Für das Entnehmen ist eine Absaugvorrichtung an der Reinigungseinheit vorhanden. Es handelt sich um ein offline System, bei dem die Proben in Ruhelage vermessen werden. Die durchgeführten Messungen sind mit diesem System als „statische Messungen“ bezeichnet. Dieses Grundsystem war bereits mit zwei Messkammern, die parallel vermessen werden, ausgestattet. Hierdurch

ist eine Referenzmessung möglich, so dass durch Differenzbildung gemessene Ultraschallgeschwindigkeiten ausgewertet werden können.



Abbildung 21: Statisches URT-Messgerät von TF-Instruments (Heidelberg, Deutschland). Die Temperiereinheiten (A) und der Messblock (B) sind gezeigt.

Für die geplante Anwendung im Downstreamprocessing ist eine hohe Präzision der Messdaten erforderlich. Durch die Messung der Ultraschallgeschwindigkeit alleine wird kein eindeutiges Messsignal erhalten. Um die Ultraschallgeschwindigkeitsveränderung einer Komponente der Lösung, z. B. einem Protein, zuordnen zu können, wird die Referenzmessung genutzt. Die Referenzprobe enthält nicht die zu untersuchende Komponente, sondern besteht nur aus dem „Hintergrund“ der Probe. Die Bezeichnung Hintergrund wird synonym für -der Probe entsprechend, ohne das Untersuchungsobjekt selbst zu enthalten- verwendet. Durch die Differenzbildung zwischen der Ultraschallgeschwindigkeit der Probe und der Referenz wird ein spezifisches Signal, z. B. für das untersuchte Protein, erhalten.

Für das angestrebte Online-System wurde das Ultraschallgeschwindigkeits-Messgerät weiterentwickelt. Ein zweiter Versuchsstand wurde mit einem Durchflusssystem eingerichtet. An beiden Versuchsständen war es möglich parallel Messungen durchzuführen. Die Messungen mit dem Durchflusssystem werden zum besseren Verständnis mit „Durchflussmessung“ bezeichnet. Der entscheidende Unterschied zwischen den Messaufbauten liegt bei der Befüllung der Messkammern. Diese wird beim Durchflusssystem automatisch durchgeführt. In Abbildung 22 ist links der Messblock der statischen Messeinheit (A) in Draufsicht gezeigt. Die beiden Seiteneinlässe in die Messkammern, die in Abbildung 18 der Skizze zu entnehmen sind, sind in der Mitte als Vertiefungen zu sehen. Im rechten Bild ist die erste Variante des Durchflusssystems (B) zu sehen. An das statische Basissystem wurde eine Dosierpumpe mit eigener Steuerung angeschlossen.

Durch die entsprechenden baulichen Anpassungen bietet die Durchflusszelle die Möglichkeit die Probe im Durchfluss zu messen. Dies stellt den ersten Schritt zur online Sensorik dar. Daraufhin wurde mit den Arbeiten zum Einfluss der Pumpgeschwindigkeit auf die Ultraschallmessung (4.1.1) begonnen.

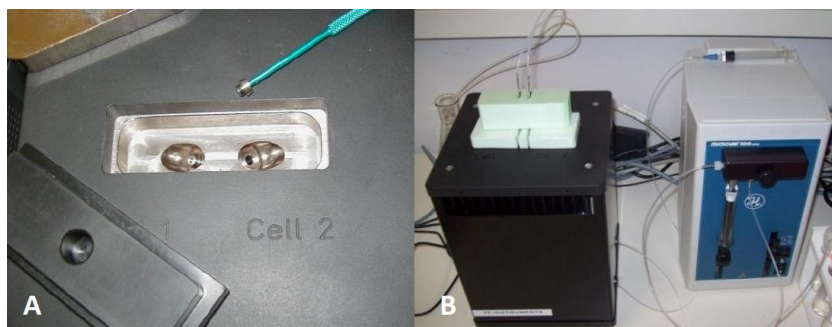


Abbildung 22: Das statische Messgerät (A) ist in Draufsicht, das Durchfluss-System mit Pumpe (B) in Gänze gezeigt.

Die angeschlossene Spritzenpumpe (B) ermöglicht ein begrenztes Volumen von 2 mL während der Messung durch die Messzelle zu leiten. Die Referenzprobe wird ebenfalls mit einer Spritze eingefüllt. Diese Spritze war jedoch nicht an die Pumpe angeschlossen. Somit war ein Durchfluss der Referenz während der Messung nicht möglich. Nach ersten erfolgreichen Durchflussmessungstests wurde diese Pumpe durch eine Peristaltikpumpe (Abbildung 24) ersetzt, um ein vollständiges Durchflusssystem zu realisieren. Der abschließende Aufbau des Durchflusssystems ist im Schema in Abbildung 23 gezeigt. Der Aufbau dient der Simulation einer Prozessanalytik, die online in den Prozess eingebunden ist. Aus zwei Vorlagegefäßen werden der Trägerstrom und die vorbereitete Probe durch Pumpen entnommen. Über Blasenfallen geleitet gelangen die Probe und der Trägerstrom in die Dialyseeinheit, bevor die Ströme in die URT-Messeinheit geleitet werden. Trägerstrom und Probe werden in den beiden Messkammern parallel vermessen. Die Messdaten werden zur Auswertung an einen PC übertragen. In diesem Aufbau ist keine Rückführung der Probe vorgesehen, so dass die Proben anschließend verworfen werden.

Die für diesen Online-Aufbau entscheidenden Komponenten sind die in Abbildung 23 zu sehenden baulichen Besonderheiten, wie die Verwendung von Blasenfallen und der Einsatz einer Dialyseeinheit. Proben, die einem laufenden Prozess entnommen sind, weisen eine schwankende Konzentration an Solventien auf.

Salzionen werden z. B. an Membranen gebunden und so der Lösung entzogen. Um das Signal des Proteins vor diesem, sich stetig ändernden Hintergrund, zweifelsfrei nachweisen zu können, ist daher eine Anpassung der Referenz nötig. Der Einsatz einer Dialyse, die für diese spezielle Anwendung von TRACE Analytics, Braunschweig, entwickelt wurde, gewährleistet den Abgleich zwischen Probenhintergrund und Referenzprobe (siehe Anhang 6.1). Der Einsatz von Blasenfallen ist ebenfalls notwendig, da Luftblasen einen hohen Störfaktor bei der Bestimmung der Ultraschallgeschwindigkeit bilden. Durch die zusätzlichen Stoffübergänge wird das Ultraschallsignal teils reflektiert. Da Gase sehr kompressible Fluide sind, wird das für ein wässriges System ausgelegte Ultraschallsignal insgesamt soweit abgeschwächt, dass keine stabile Messung möglich ist. Dieses Problem kann durch den Einbau von Blasenfallen vor den Messzellen umgangen werden (siehe Punkt 6.2).

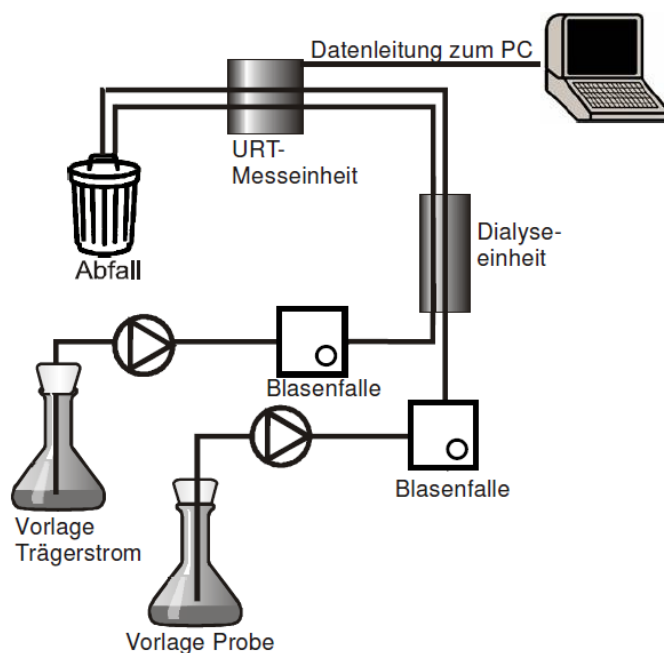


Abbildung 23: Schematischer Aufbau des Durchflusssystems zur Simulation einer Prozessanalytik.

Beide bereits gezeigten Messsysteme werden mittels Luft temperiert. Damit ist die Messtemperatur stark von der Umgebungstemperatur abhängig. Die Diskussion des Temperatureinflusses auf die Ultraschallgeschwindigkeit ist unter 4.2.1 dargestellt. Um für reproduzierbare Messbedingungen die Temperaturstabilität zu erhöhen, erfolgte ein weiterer Umbau der Messzelle durch TF Instruments. Wie Abbildung 24 zeigt erfolgt die Temperierung der Messeinheit dabei durch einen

Thermostat, mit dem ebenfalls eine Vortemperierung der Vorlagebehälter möglich ist. Die im Bild zu sehenden Blasenfallen arbeiten mit einem Gegendruck von 2 bar. Ihre Funktionsweise ist unter Punkt 6.2 beschrieben. Beim Messen ergaben sich Schwankungen im Gegendruck, so dass die Blasenfallen nicht zuverlässig arbeiten konnten. Aus prozesstechnischen und baulichen Gründen wurden sie daher durch einen Degasser (6.2) ersetzt. Dieser entzieht durch einen intern erzeugten Unterdruck der Lösung gelöste Gase, so dass es nicht mehr nötig ist, das ganze System mit einem Gegendruck zu betreiben. Diese Änderung führte zu einem stabiler arbeitenden Messsystem.

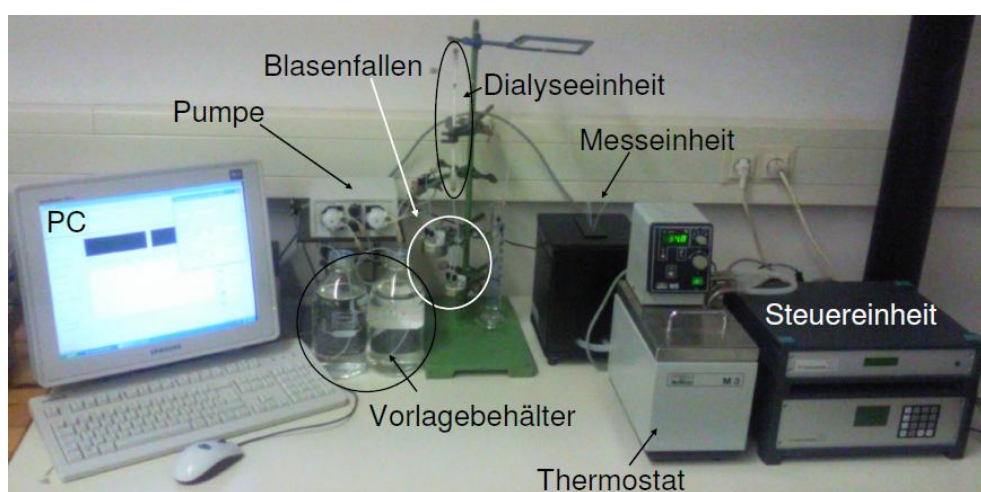


Abbildung 24: Laboraufbau der Messanlage. Die Messeinheit ist an den Thermostat im Vordergrund angeschlossen. Die Steuereinheit regelt die Temperatur der Messzellen. Die Probe und Referenz werden aus den Vorlagebehältern mit der Pumpe entnommen. Nach dem Passieren der Blasenfallen gelangt die Lösung über die Dialyse in die Messzellen der Messeinheit. Der PC dient der Datenaufnahme und -auswertung.

Die Vereinigung der einzelnen Messsystembestandteile mit dem Degasser, in einem Proteinmonitorprototyp war der finale Schritt. Dieser kann online an Small-scale-Prozesse angeschlossen werden. Der fertige Proteinmonitor ist in Abbildung 25 zu sehen. Er arbeitet, mit der am Institut für Technische Chemie (Leibniz Universität Hannover) entwickelten Software. Sie ist wie der Monitor ein Prototyp und entwickelte sich fortlaufend bis zur heutigen Version weiter. Die Fertigung der Software und die Automatisierung des Proteinmonitors sind mit der vorliegenden Arbeit nicht abgeschlossen und werden im Rahmen des BMBF geförderten Projektes PROTEINMONITOR weitergeführt.



Abbildung 25: Foto des Proteinmonitor Prototypen. Im unteren Segment des Kopfteils (A) befinden sich die Pumpe und die Messeinheit. Darunter ist die Temperiereinheit (B) angebracht.

In Abbildung 26 ist der geplante automatisierte Prozessmonitor schematisch dargestellt. Die baulichen Voraussetzungen sind dafür erfüllt. Durch den Einbau von fünf 3-Zweiwegeventilen (grün) und einem T-Stück (rot) und durch die Anpassung der Software ist es möglich die Arbeitsschritte *Messen*, *Spülen* und *Regenerieren* zu steuern.

Beim Schritt *Messen* wird die Referenz durch die Pumpe 1 und die eigentliche Probe mittels Pumpe 2 aus den entsprechenden Vorlagen entnommen. Die Referenz wird in der Dialyseeinheit (siehe Anhang 6.1) durch die Fasern geleitet, während die Probe im Mantel die Dialyse passiert. Anschließend wird die Referenz in Messzelle 1, die Probe in Messzelle 2 vermessen. Jeweils vor und nach der Messung wird das Spülen des Systems mit deionisiertem Wasser (DI) optional eingesetzt. Einerseits dient dies der Reinigung der Anlage, da Lösungsreste entfernt werden, andererseits kann somit das Messsystem kontrolliert werden. Nach dem

Spülvorgang mit deionisiertem Wasser sind die erwarteten Messwerte für die Ultraschallgeschwindigkeit definiert, da diese Daten für Wasser, auch bei schwankender Temperatur, bekannt sind. Die Messung nach dem Spülen dient der Kontrolle der Reinigung und der gesamten Anlage. Das Spülen mit deionisiertem Wasser ist die einzige für die Messzellen vorgesehene Reinigung der Messzellen. Durch diese schonende Behandlung soll die Goldbeschichtung der Zellen geschont werden.

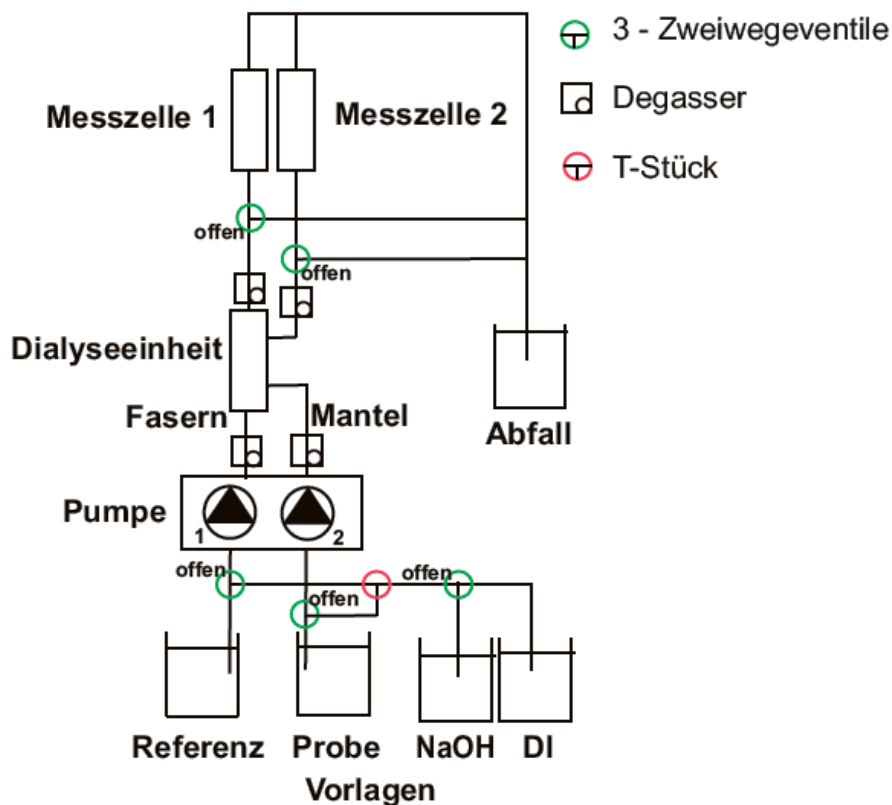


Abbildung 26: Schematischer Aufbau des Proteinmonitors.

Der Schritt *Regenerieren* betrifft lediglich die Dialyseeinheit. Natronlauge wird nach der Dialyse in den Abfallbehälter geleitet. Beim Regenerieren lösen sich durch den hohen pH-Wert etwaige organische Rückstände aus der Dialyse und gewährleisten somit, dass die Dialyseleistung erhalten bleibt. Alle gut wasserlöslichen Rückstände wurden beim vorhergehenden Spülen bereits entfernt. Die Rückstände der Natronlauge nach dem Regenerieren werden ebenfalls durch deionisiertes Wasser an den Messzellen vorbei aus dem System geleitet.

Die Automatisierung wird jedoch aufgrund des flexiblen Einsatzes für verschiedene Prozesse noch nicht eingesetzt, da sie einer Optimierung für jeden Beispielprozess bedarf. Ein anderer Vorteil des fertigen Prototyps, die parallele Temperierung des Gehäuses und der Messeinheit, wurde dagegen genutzt, um Messungen mit optimierter Temperaturstabilität durchzuführen. Die Software steuert den Thermostat und kontrolliert die Temperatur in Gehäuse und Messkammern. Die Gehäusetemperierung dient der Vortemperierung der Proben und der Temperierung der Dialyseeinheit. Somit kommt es durch die Probentemperatur kaum zu Schwankungen der Temperatur in den Messkammern und das Dialyseverhalten ist ebenfalls stabilisiert. Auf die Temperatur wird unter Punkt 4.2.1 genauer eingegangen. Die Gesamtentwicklung des Systems ist in Abbildung 27 zusammengefasst.

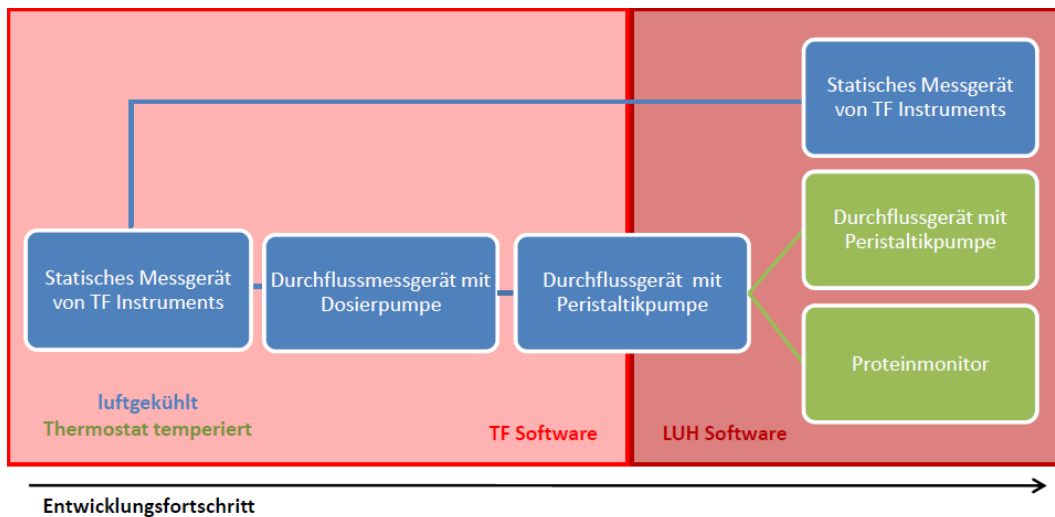


Abbildung 27: Die Entwicklung des Messgeräts auf einen Blick. Zu sehen ist die parallele Entwicklung der Hard- und Software.

Zunächst standen für die Entwicklung des Systems die Bestimmung der Pumpgeschwindigkeit und die Verwirklichung der Online-Messung im Fokus.

4.1.1 Einfluss der Pumpgeschwindigkeit auf die Ultraschallmessung

Der Einbau einer Pumpe zum Messen bei durchflossener Messzelle verändert die Randbedingungen der Ultraschallmessung. Ziel der Versuche zum Einfluss der Pumpgeschwindigkeit auf die Messung der Ultraschallgeschwindigkeit war die Ermittlung einer optimalen Arbeitspumpgeschwindigkeit. Dazu wurden Messungen mit der statischen Messeinheit durchgeführt und die erhaltenen Daten mit denen des Durchflusssystems korreliert. Der Vergleich zwischen statischer und der Dosierpumpen betriebenen Durchflussmessung am Beispiel Kaliumchlorid (KCl) ist in Abbildung 28 dargestellt.

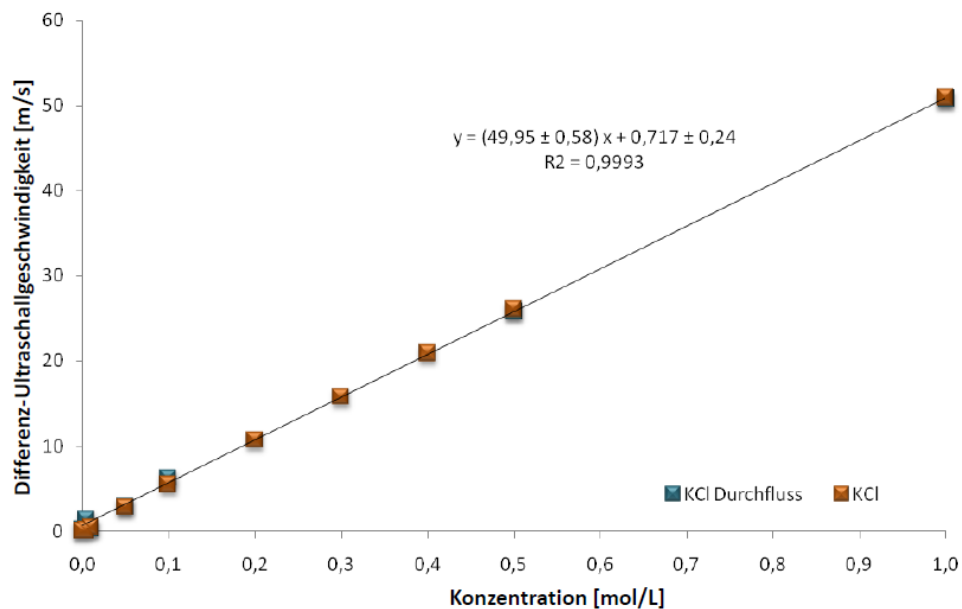


Abbildung 28: Vergleich der Ergebnisse der Messungen am statischen und Durchflusssystem. Die Präzision der Messungen ist auf Grund des Maßstabs nicht zu sehen.

Während der Messung verbleibt die Referenzprobe in Messzelle 1 in Ruhelage. Gleichzeitig werden 2 mL Probe durch die Messzelle 2 geleitet. Die Dosierpumpe hat eine Geschwindigkeit von 0,16 mL/min. Daher wurden die Werte für diese Pumpgeschwindigkeit und verschiedenen konzentrierte Salzlösungen untersucht. Die Messungen zeichnen sich durch eine hohe Präzision (siehe Anhang 6.3.6.1) aus. Geringe Abweichungen zwischen den Messreihen sind auf die Präparation der Proben zurückzuführen.

Diese ersten Ergebnisse belegten zunächst die Möglichkeit, der Messung im Durchfluss. Nach dem Einbau der Schlauchquetschpumpe stand für die Pumpgeschwindigkeitsversuche eine breitere Variationsmöglichkeit der Einstellungen zur Verfügung. Allerdings kommt es, durch das den Peristaltikpumpen eigene Pulsen des Fluidstroms, bei höheren Pumpgeschwindigkeiten zu Unregelmäßigkeiten im Volumenstrom. Die Abgabe des Fluids erfolgt dann stoßweise statt regelmäßig.

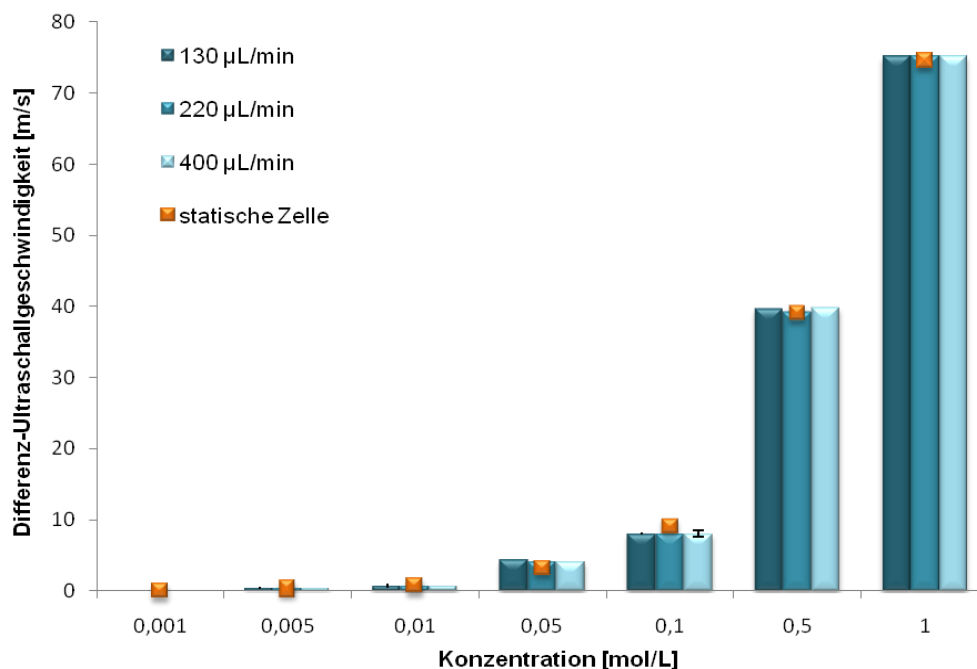


Abbildung 29: Vergleich der Messwerte des statischen Systems verschieden konzentrierter Natriumhydrogencarbonat-Lösungen mit den Daten der Durchflussmesszelle bei unterschiedlichen Pumpgeschwindigkeiten.

Bei einem Volumenstrom von 0,2 mL/min wird das Messzellenvolumen bei idealem Verhalten in einer Minute ausgetauscht. In Abbildung 29 sind entsprechende Versuchsergebnisse einer Messreihe mit Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) aufgeführt. Sie belegen, dass der Durchflussbetrieb einer solchen Messeinheit im gewählten Rahmen ohne einen Verlust an Messgenauigkeit möglich ist.

Aufgrund der Messergebnisse wurde im Folgenden mit einer Pumpgeschwindigkeit von 400 µL/min gearbeitet. Dies entspricht einer hydrodynamischen Verweilzeit von 30 sec. Die Dialyseeinheit wurde weiterhin bei der Firma Trace Analy-

tics, Braunschweig, untersucht und für diese Bedingungen als tauglich beurteilt. Eine zeitnahe Analytik und Abbildung von Prozessbedingungen ist somit möglich.

Versuche zur Zuverlässigkeit des Durchflusssystems schlossen sich an diese Untersuchungen an. In Abbildung 30 ist ein entsprechender Versuch gezeigt. Es wurde ohne Dialyse und im FIA-Modus (**F**ließ**i**njektions**a**nalyse) gearbeitet. Die eingesetzten Proben von Harnstofflösung konnten reproduzierbar vor einem stabilen Referenzhintergrund abgebildet werden. Zwischen den Proben der 0,5 mol/L Harnstofflösung wurde längere Zeit mit dem Trägerstrom (hier deionisiertes Wasser als Referenz) gespült. Die Grundlinie der Messung ist dabei über mehr als 36 h stabil. Die anschließend induzierte 0,5 mol/L Harnstoff-Probe zeigt wieder den gleichen Anstieg der Ultraschallgeschwindigkeit.

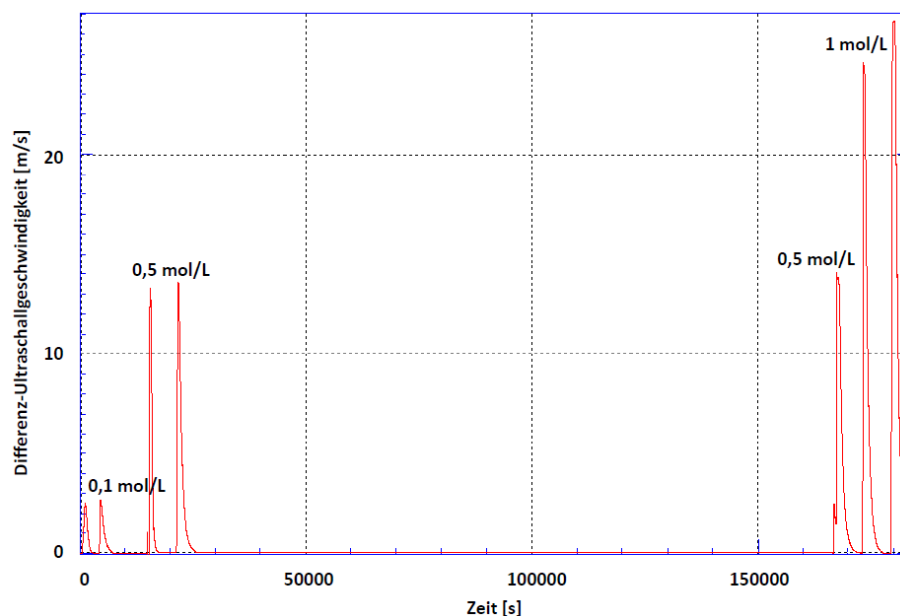


Abbildung 30: Verlauf einer FI-Analyse mit Harnstofflösungen verschiedener Konzentration. Zwischen den Messungen wurden die Messzellen mit deionisiertem Wasser gespült.

In Abbildung 31 sind zu den mit dem Durchflusssystem gemessenen Daten die Werte der Messung mit der statischen Zelle im Vergleich dargestellt. Über die x-Achse der Durchflussmessung ist die Achse für die Harnstoffkonzentration der statischen Messung gelegt.

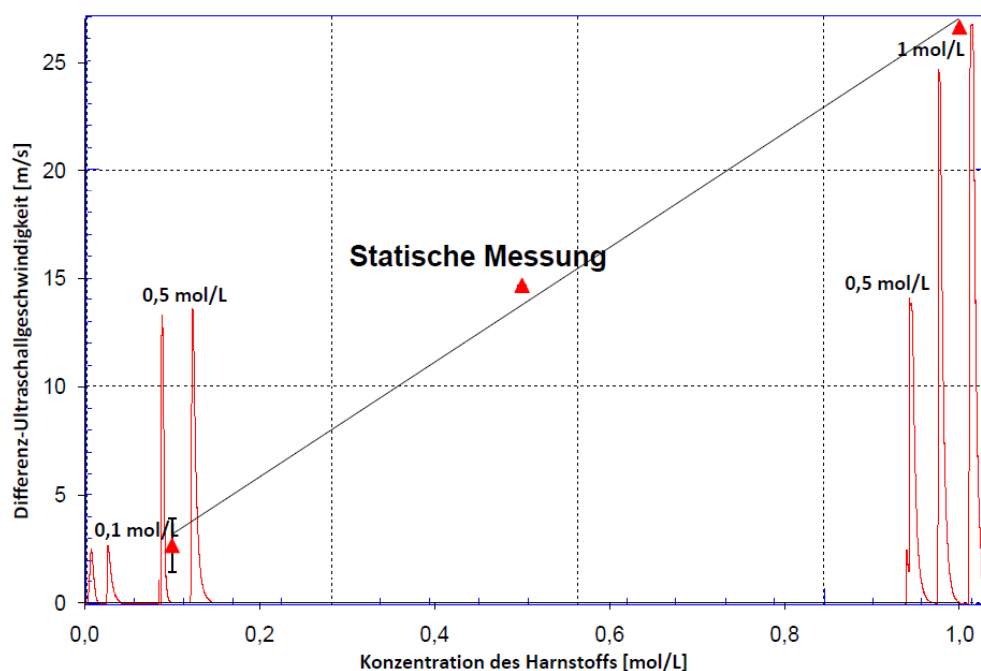


Abbildung 31: Vergleich der Messungen der Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit verschieden konzentrierter Harnstofflösungen des statischen und des Durchflusssystems. Die FIA-Daten sind dem Graphen aus Abbildung 30 entnommen. Die Präzision (siehe Kapitel 6.3.6.1) der Messwerte ist nur für den Wert bei 0,1 mol/L beim gewählten Maßstab im Graphen zu sehen.

Auch dieser Vergleich belegt die Durchführbarkeit der online Durchflusssmessung. Am ersten Signal der 1 mol/L konzentrierten Harnstofflösung lässt sich allerdings erkennen, dass die eingesetzte Probenmenge beachtet werden muss, um ein sauberes Signal zu erhalten. Die Probenmenge wurde von der ersten zur zweiten 1 mol/L Messung erhöht, um dies zu gewährleisten.

Versuche wie diese mit Harnstofflösungen wurden im Laufe des Projektes, zum besseren Verständnis der Gesetzmäßigkeiten und um eine Kontrollfunktion etablieren zu können, mit verschiedenen Salzen, Kohlenhydraten und anderen, für einen Bioprozess typischen, Solventien durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden ab Abschnitt 4.2.4 beschrieben.

Der Fokus liegt auf der Anwendung im Downstreambereich und der Detektion von Proteinen und ihren Konformationsänderungen. Die Referenzmethode soll dabei vermeiden, dass die Empfindlichkeit der Messmethode von Proteinstruktur unbeeinflussenden Solventien gestört wird. Bei Solventien, die die Proteinstruktur beeinflussen, kann dadurch der genaue Effekt untersucht werden.

Als Grundvoraussetzung für diese hochauflösenden Ultraschallgeschwindigkeitsmessungen ist ein stabil und reproduzierbar arbeitendes Messsystem mit Steuerungssoftware unabdingbar.

4.2 Ultraschallmessungen

Die Softwareentwicklung für den neu gebauten Proteinmonitor wurde im Rahmen einer Masterarbeit ¹²⁹ und einer laufenden Dissertation erstellt. Zur Testung der Soft- und Hardware wurden die Messsysteme auf Messgenauigkeit und Reproduzierbarkeit untersucht. Durch die Variation des Messaufbaus und einzelner Komponenten der Lösung wurde eine Datenbasis für die Entwicklung der Steuerungs- und Auswertesoftware erzeugt. Dazu wurden zunächst Versuche durchgeführt, für die bereits Vergleichswerte durch etablierte Referenzmethoden vorlagen. Der Einfluss der Versuchsparameter auf die gemessene Ultraschallgeschwindigkeit konnte somit mit den Literaturwerten korreliert werden. In den Versuchen wurden die Messbedingungen: Temperatur, Konzentration von Cosolventien (Lösungsbestandteile, die nicht zum Zielprotein gehören) und Einfluss der Ionenstärke bei Salzen variiert. Abschließend wurden Messungen mit Beispielproteinen zur Simulation des Downstreamprocessing durchgeführt. Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen sind den Unterpunkten zugeordnet.

4.2.1 Temperatureinfluss auf die Ultraschallgeschwindigkeit

Dem in Abbildung 32 gezeigten Zusammenhang folgend, gilt, dass die Ultraschallgeschwindigkeit mit steigender Dichte und sinkender adiabatischer Kompressibilität steigt. Dies ergibt sich logisch aus dem im Teil 3 beschriebenen Verhalten für die Ausbreitung von Schallwellen. Es ist eine Bewegung von Teilchen. Bei größerem Abstand zwischen den Teilchen, muss dieses selbst die Strecke überwinden, um die Schallenergie weiterzugeben. Dies dauert entsprechend länger als ein direkter Teilchen-Teilchen-Kontakt, da es an die Barrieren der Teilchenbewegung gebunden ist.

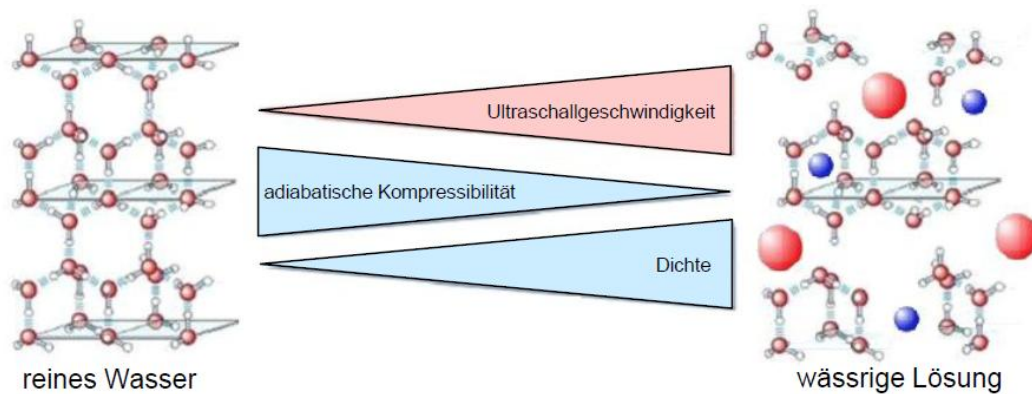


Abbildung 32: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Ultraschallgeschwindigkeit, adiabatischer Kompressibilität und Dichte.

In den meisten Flüssigkeiten fällt daher die Ultraschallgeschwindigkeit mit steigender Temperatur. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, das Messgerät temperaturstabil auszuliegen.

Der Proteinmonitors ist auf den Einsatz im Aufreinigungsbereich und das Vermessen von wässrigen Proben ausgelegt. Die Dichte-Anomalie des Wassers sorgt auch im Fall der Ultraschallgeschwindigkeit für ein abweichendes Verhalten von der Regel.

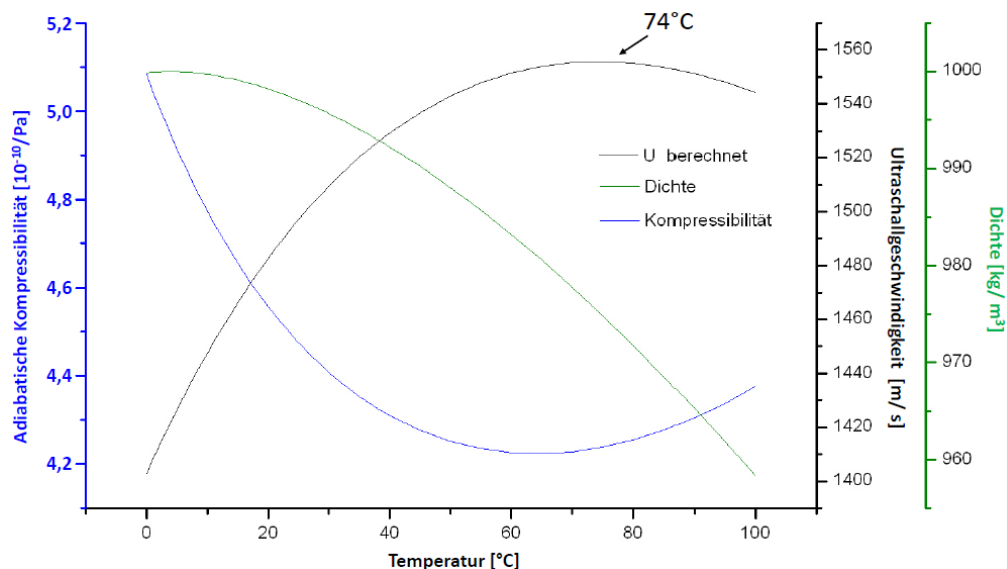


Abbildung 33: Über die Gleichung 7 aus Literaturdaten, für die adiabatische Kompressibilität und Dichte, berechnete Ultraschallgeschwindigkeit für Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur.

In Abbildung 33 ist die Ultraschallgeschwindigkeit, berechnet nach der Laplace-Formel ⁶ in Gleichung 7 aus Literaturdaten (siehe Anhang 6.4) für die adiabatische Kompressibilität (β_{ad}) und Dichte (ρ) des Wassers, als Funktion der Temperatur dargestellt.

$$U = \sqrt{\frac{1}{\beta_{ad} \cdot \rho}} \quad (7)$$

Der Verlauf zeigt die typische Parabelform. Das Maximum von rund 1.555 m/s wird bei ca. 74 °C erreicht, wie es auch Del Grosso und Mader (1972) beschreiben ¹³⁰. Die Werte sind der Tabelle 23 im Anhang 6.3.5 zu entnehmen ¹³¹. Die Übereinstimmung des in diesem Graphen verwandten Modells mit den real gemessenen Daten ist der Abbildung 34 zu entnehmen.

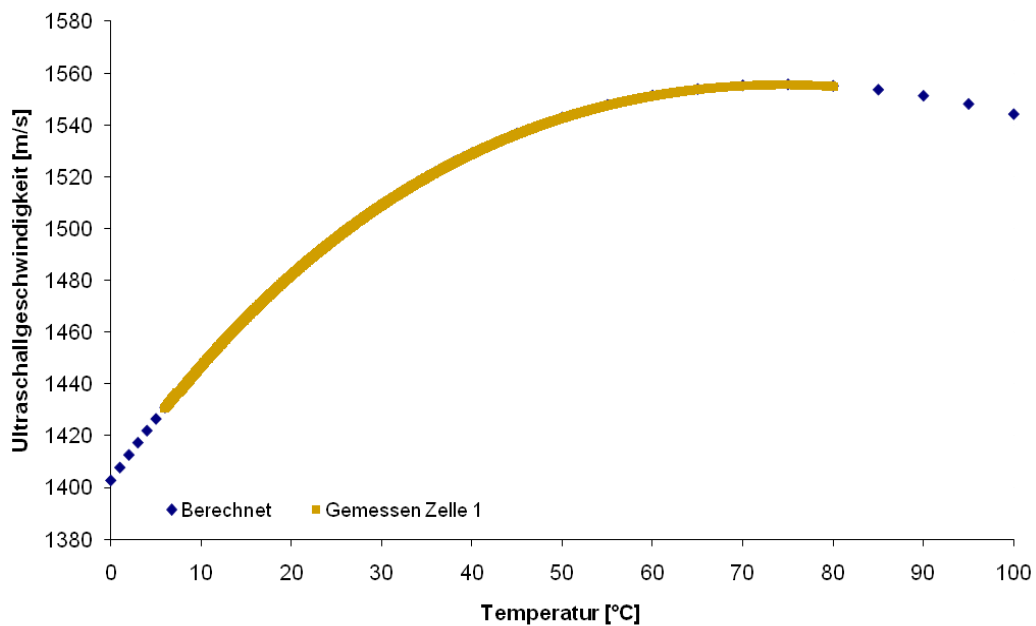


Abbildung 34: Graphischer Vergleich der Daten für Wasser zwischen der Berechnung, nach der Laplace-Formel ⁶ aus Literaturdaten für Kompressibilität und Dichte, und den in Gelb gezeigten, mit dem statischen URT-System gemessenen Daten.

Die Messungen wurden mit dem statischen Gerät durchgeführt. Die Messdaten sind in der Tabelle 24 im Anhang 6.4 enthalten. Die Messdaten zu den gezeigten Messpunkten sind in Abbildung 35 gezeigt. Die Abweichung der Gemessenen

Daten von den nach dem Modell berechneten wird mit dem RMSEP (Root-Mean-Square Error of Prediction) angegeben und beträgt 0,3073 m/s. Diese Abweichungen der Geschwindigkeit im für das Messgerät untypischen Dezimeterbereich sind der Initialisierung bei 25 °C und messbedingten Anpassungen in der Korrelation geschuldet. Referenzdaten liegen nur für ganze Grad Celsius vor. Diese wurden beim Messen des Temperaturbereichs von 5 °C-80 °C nur näherungsweise getroffen. Dadurch wurde eine Mittelwertbildung der gemessenen Daten um die durch die Referenz gegebenen Temperaturen für den Vergleich der Daten vorgenommen. Die gemessenen Daten lagen jedoch teilweise mehrere Dezikelvin über oder unter der Zieltemperatur. Somit ist der RMSEP-Wert mit einem nicht unerheblichen Temperaturfehler behaftet.

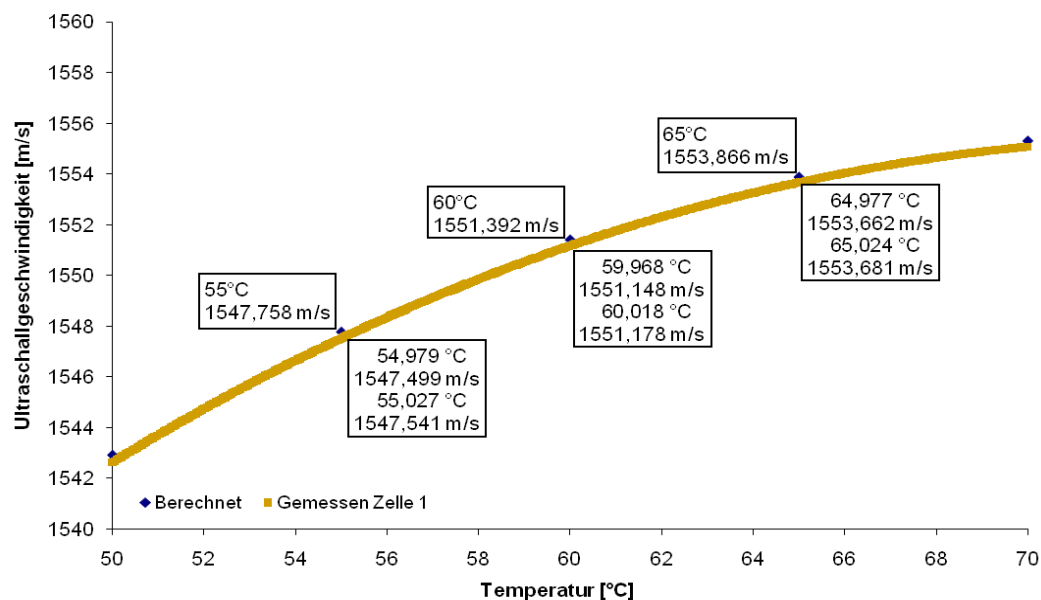


Abbildung 35: Höhere Auflösung des Graphen aus Abbildung 34 mit Ergänzung der Messwerte (über den Datenreihen) und berechneten Werte (unter den Datenreihen).

Dass das Temperaturverhalten berücksichtigt werden muss, verdeutlichen die steigungsabhängigen Einflüsse bei Temperaturschwankungen in Tabelle 7. Dies veranschaulicht, wie empfindlich die Messung im für das Downstreamprocessing typischen Temperaturbereich um 25 °C auf Schwankungen reagiert.

Tabelle 7: Die Änderung der Ultraschallgeschwindigkeit in Wasser in Abhängigkeit von der Steigung der Ultraschallgeschwindigkeits-Temperatur-Kurve ¹²⁵.

Temperaturbereich [°C]	Steigung [(m/s)/ °C]
~ 85	~ 0,3
~ 50	~ 1
~ 25	~ 3
~ 5	~ 5

Das Modell bietet also eine passende Grundlage für die weiterführenden Überlegungen. Im Bereich nahe dem Maximum von 74°C oder auch im Bereich von 85°C führen Temperaturschwankungen zu nur geringen Änderungen der Ultraschallgeschwindigkeit. Bei 25 °C liegen diese jedoch bei ~3 m/s pro °C Temperaturdifferenz. In Abbildung 36 ist dazu beispielhaft ein Diagramm gezeigt, dass die gemessenen Daten des statischen Messsystems und die daraus ermittelte Geschwindigkeitsvarianz abbildet.

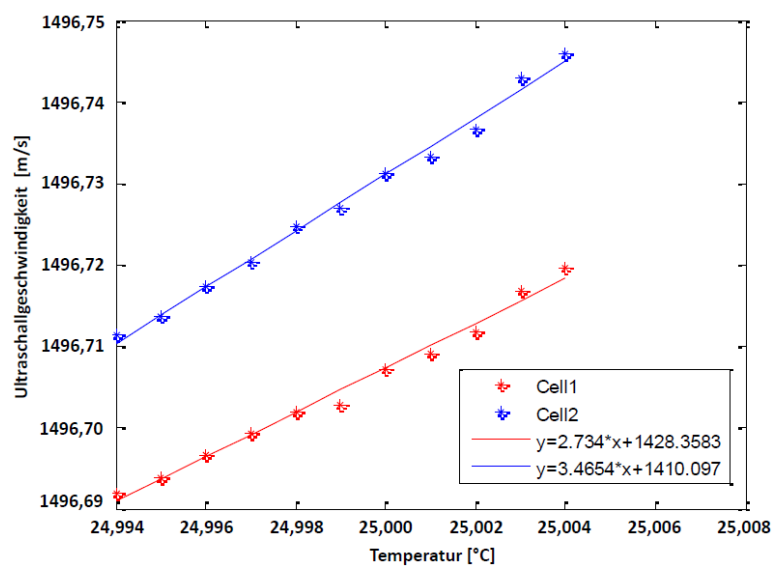


Abbildung 36: Mit dem statischen URT-System gemessener Einfluss der Temperatur auf die Ultraschallgeschwindigkeit von deionisiertem Wasser.

Es wurden Messungen um 25 °C mit dem statischen URT-System durchgeführt. Die erwartete Abweichung betrug ~ 3 m/s pro °C. Der gemessene Temperaturbereich umfasst insgesamt 10 mK. Die bestimmten Differenzwerte liegen mit Werten von 2,7 m/s für Messzelle 1 und 3,5 m/s für Messzelle 2 im erwarteten Bereich. Der Bereich um 25°C ist von großem Interesse für das Projekt, da in diesem

oder im niedrigeren Bereich die Aufarbeitung der Proteine stattfindet. Dass das ursprüngliche System stark auf Temperaturschwankungen anspricht, ist in Abbildung 37 an einer Beispielmessung gezeigt. Der Graph ist mit der geräteeigenen Software erstellt. Die blaue Kurve gibt die Temperatur an. Ihr folgen die schwarze Kurve der Messzelle 1 und die rote Kurve der Messzelle 2 in parallelem Verlauf zur Temperatur. Die Differenz der Messzellen 1 und 2 von 0,02 m/s liegt im Bereich der Fehlertoleranz.

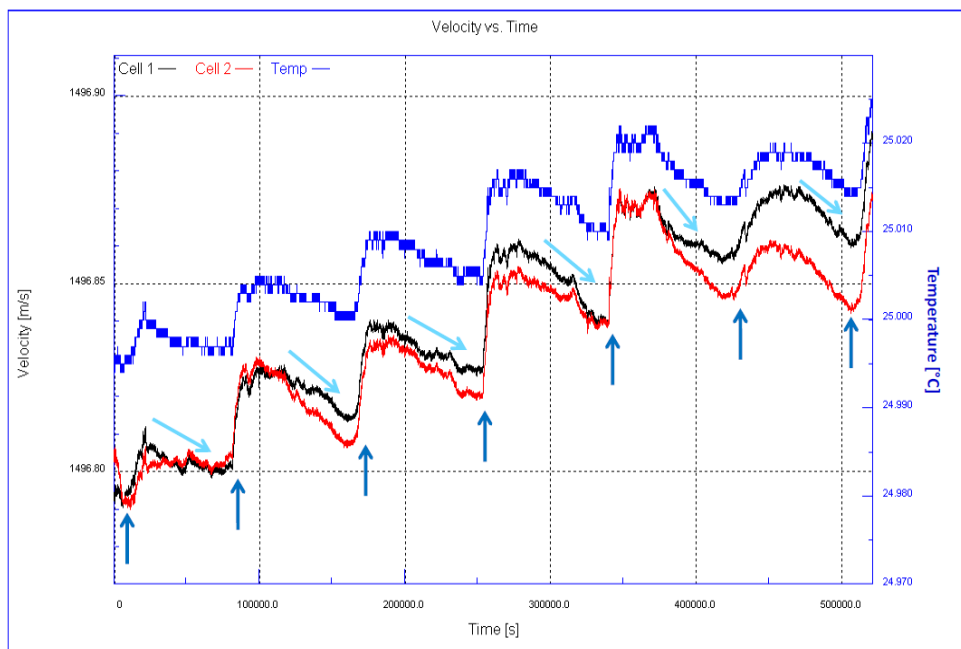


Abbildung 37: Eine Beispielmessung über ~6 Tage mit Luftkühlung und der „alten“ Software (der Original Software von TF Instruments). Rechts ist die Temperatur in blau abzulesen. Die Temperatur sinkt zur Nacht ab (hellblaue Pfeile) und steigt zum Tag an (dunkelblaue Pfeile).

Abbildung 37 zeigt eine Auswertung, wie sie mit der Software von TF Instruments, Heidelberg, graphisch dargestellt wird. Die Auftragung erfolgt von Geschwindigkeit (velocity) in m/s gegen die Zeit (time) in s. Das luftgekühlte System ist stark von der Raumtemperatur abhängig. Die Messung verfolgt die Temperaturschwankungen über 6 d. Die untere Zeitskala ist in Sekunden angegeben. Die Abschnitte entsprechen < 28 h. Die Temperaturveränderungen über einen Tag sind kleineren Bereichen als den Abschnitten zuzuordnen. Der Wechsel zwischen Tag und Nacht ist dabei stets mit einer leichten Abkühlung des Systems zur Nacht (hellblaue Pfeile) und einem erneuten Anstieg zum Tag hin (dunkelblaue Pfeile).

Pfeile) zu verfolgen. Über einen Tag schwankt die Messung dabei um durchschnittlich 10 mK. Insgesamt ist ein Temperaturdrift um 30 mK zu beobachten. Der Temperatureinfluss auf die Ultraschallgeschwindigkeit bei reinem Wasser ist durch die beschriebene Anomalie nicht linear. Für reines Wasser ist der rechnerische Ausgleich von Temperaturschwankungen durch die während der Messung auf ein Tausendstel bestimmte Temperatur dennoch denkbar. Die Übertragung auf andere wässrige Lösungen ist dagegen schwieriger. Um Temperaturschwankungen rechnerisch entgegenzuwirken, muss eine Kalibration für die Lösung und den Temperaturbereich vorliegen. Da eine einfache Zweipunkt-Kalibration für den Zusammenhang Ultraschallgeschwindigkeit-Temperatur nicht ausreicht, würde eine Kalibration einen nicht unerheblichen zeitlichen Mehraufwand bedeuten. Die geplanten Anwendungssysteme sind dafür jedoch nicht genug charakterisiert. Die Verbesserung der Temperaturkontrolle war daher das gewählte Mittel, wie die Umbauten am System in Kapitel 4.1 veranschaulichen. Die Vorteile des Grundsystems (kleines Probevolumen, Differenzmessung, hochauflösende Ultraschallmessung) bleiben dabei unverändert. Die beiden Messzellen sind gleichtemperiert und der Messwert wird durch Differenzmessung erhalten. Damit ist gewährleistet, dass der erhaltene Messwert als charakteristisch für die Probe erkannt wird.

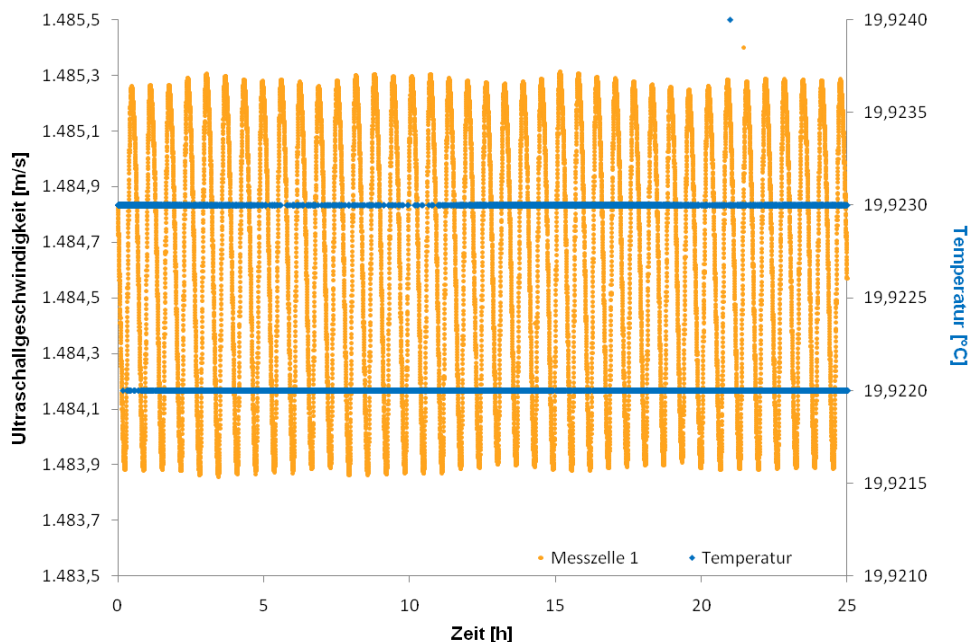


Abbildung 38: Beispielmessung einer Intervallzugabe von 0,04 % (m/m) NaCl-Lösung bei konstanter Temperatur über 25 h. Die blauen Daten beziehen sich auf die rechte Achse und geben die Temperatur wieder.

Der Graph in Abbildung 38 zeigt einen Messverlauf mit dem Proteinmonitor, der mit dem Thermostat temperiert ist. Über 25 h schwankt der Temperaturwert im Bereich 1 mK und ist damit deutlich stabiler als im lufttemperierten System. Die gezeigte Intervallmessung von NaCl-Lösung zeigt zudem einen sehr stabilen Verlauf, auf den im Folgenden eingegangen wird. Kleine Schwankungen in der Temperatur werden durch die Referenzmessung ausgeglichen, solange beide Messzellen parallel temperiert sind.

4.2.2 Reproduzierbarkeit

Reproduzierbarkeit und Genauigkeit geben Auskunft über die Qualität und das Leistungsvermögen einer Analytik. Die gezeigte Temperaturstabilität ist ein entscheidender Faktor die Reproduzierbarkeit der Messung zu gewährleisten. Der in Abbildung 38 gezeigte Graph kann auch unter dem Gesichtspunkt der Reproduzierbarkeit betrachtet werden. Dazu ist in Abbildung 39 der Graph nochmals ohne die Temperaturmessung gezeigt.

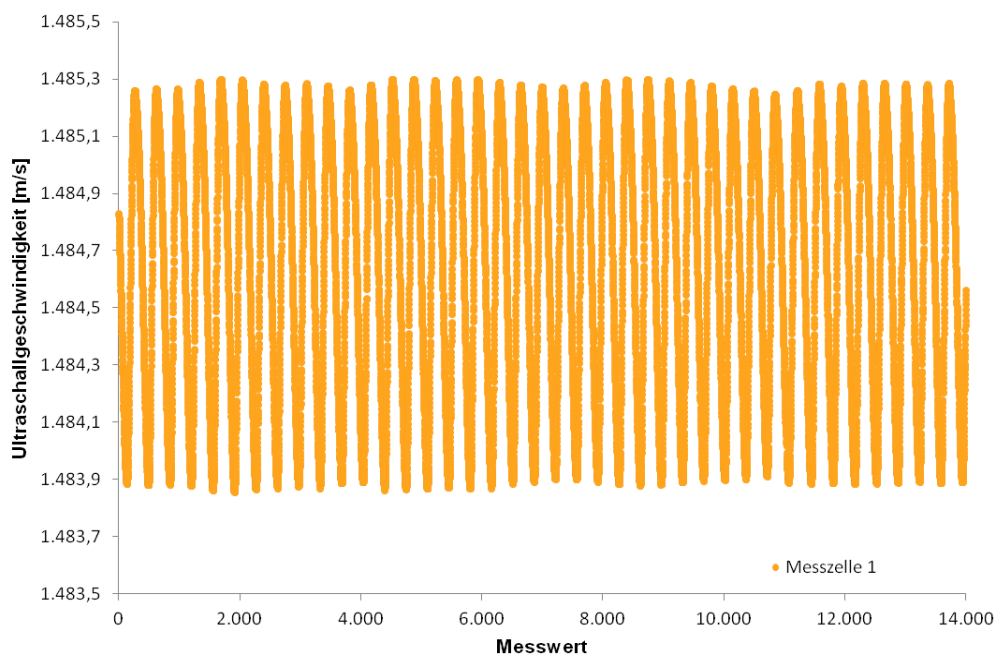


Abbildung 39: Messung einer Intervallzugabe von 0,04 % (m/m) NaCl-Lösung über 14.000 Messwerte. Die Erzeugung eines Messwerts beträgt 6-7 s. In orange ist der Verlauf der Ultraschallmessung in der Messzelle 1 zu verfolgen. Sie wird abwechselnd mit deionisiertem Wasser und NaCl-Lösung gespült.

Die Messungen sind insgesamt stabil und mit hoher Reproduzierbarkeit aufgenommen. Der gezeigte Messbereich erstreckt sich lediglich über einen Geschwindigkeitsbereich von 2,5 m/s und zeigt dabei keine erkennbaren Abweichungen. Über 40 Läufe wurden die Werte der Ultraschallgeschwindigkeit der Maxima und Minima untereinander verglichen. Ihre Präzision ist hoch und liegt im cm/s-Bereich.

Tabelle 8: Bestimmung der Präzision der Extremwerte über 40 Messläufe.

	Mittelwert der Ultraschallgeschwindigkeit [m/s]	Präzision [m/s]
Maximum	1.485,295	0,082
Minimum	1.483,882	0,012

Alle durchgeführten Messungen und die daraus erhaltenen Messwerte werden in der weiteren Arbeit mit ihrer Präzision, also ihrer Standardabweichung angegeben. Dies wurde als Maß für die Reproduzierbarkeit der Messungen festgelegt. Die verwendeten Formeln sind im Anhang 6.3.6.1 gegeben.

4.2.3 Ansprechzeit

Die Ansprechzeit des Proteinmonitors wurde als t 90-Wert bestimmt. Der t 90-Wert gibt die Zeit an, die das Messsystem benötigt um eine Änderung der Probe im Signal zu 90 % abzubilden, 90 % des Signalendwerts erreicht zu haben. Für den Aufbau ohne Dialyseeinheit bei 0,4 mL/min Volumenstrom wurde dieser Wert auf t 90 = 90 s bestimmt.

Am Beispiel des Graphen in Abbildung 40 ist die Vorgehensweise zu sehen. Bestimmt werden ein Startwert, als Basislinie der Messung (Minimum), der Endwert der Messung (Maximum) und der Zeitpunkt an dem 90 % (t 90-Wert) dieses Endwertes erreicht sind. Für die Berechnung ergaben sich die in Tabelle 10 gezeigten Daten.

Tabelle 9: Bestimmung der Ansprechzeit des Proteinmonitors. Die Zeitangaben sind der Achsenbeschriftung in Abbildung 40 folgend.

Werte	Ultraschallgeschwindigkeit [m/s]	Zeitpunkt [s]
Minimum	1.496,610	245
t90	1.501,310	335
Maximum	1.501,833	1011

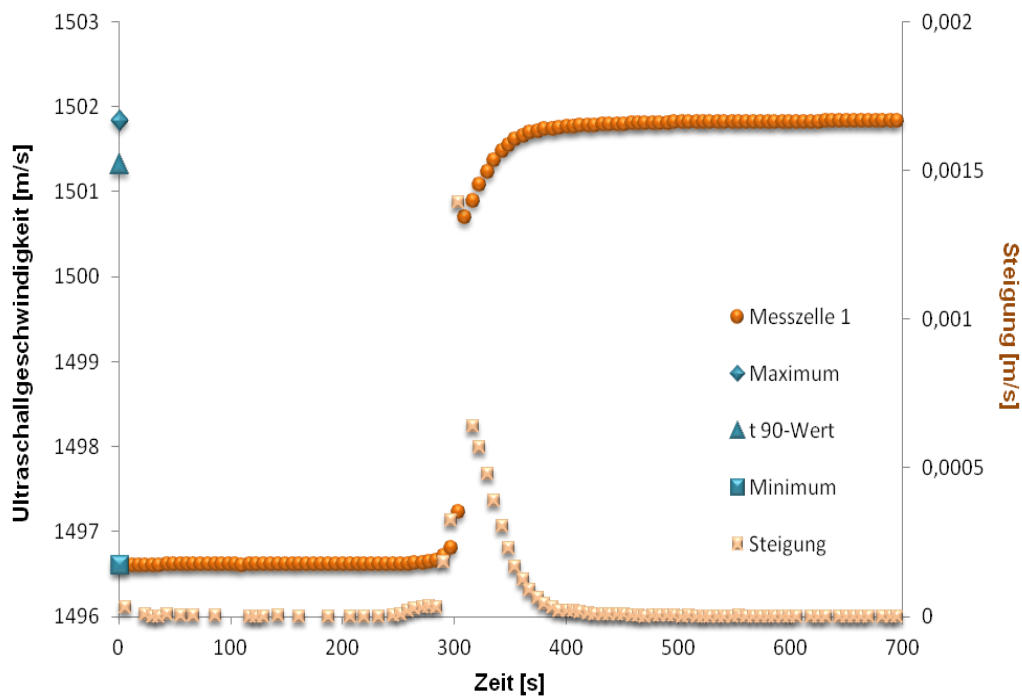


Abbildung 40: Graphische Darstellung des Ansprechverhaltens des Messsystems. Bestimmung des t_{90} -Wertes, dem Punkt an dem der Messwert zu 90 % erreicht ist. Gezeigt sind dazu die Messwerte der Messzelle 1 (orange Punkte) und die verwendeten Eckdaten (Maximum, t_{90} -Wert und Minimum in Blau).

4.2.4 Einfluss der Salzkonzentration auf die Ultraschallgeschwindigkeit

Der Temperatur-Ultraschallgeschwindigkeits-Zusammenhang wurde untersucht und hieraus Theorien entwickelt, die den Verlauf beschreiben. Für die wässrigen Lösungen hat Willard (1947)¹³¹ eine Hypothese dazu aufgestellt, wie sich die Konzentration einer Lösung auf das Temperaturverhalten auswirkt. Er kam zu dem Schluss, dass mit steigender Konzentration auch die Ultraschallgeschwindigkeit steigt. In Abhängigkeit dazu sinkt die Temperatur des maximalen Ultraschallgeschwindigkeitswerts. In Abbildung 41 ist dazu ein Beispielgraph gezeigt.

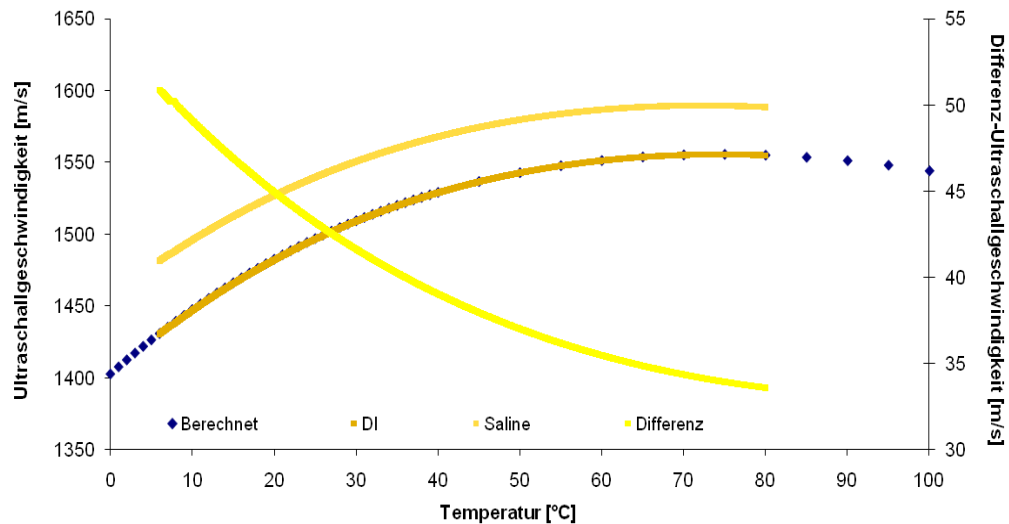


Abbildung 41: Messung einer 4 % (m/m) NaCl-Lösung (Saline) im Temperaturbereich 15-80 °C im Vergleich zum Verlauf der Messung von deionisiertem Wasser gemessen (DI) und berechnet (Berechnet). Die hellgelbe Kurve gibt die Differenz der beiden gemessenen Datenreihen an und bezieht sich als einzige auf die rechte x-Achse.

Die Probe mit deionisiertem Wasser (dunkles Orange) folgt dem für Wasser berechneten Verlauf in Blau. Sie erreicht ein Maximum bei ~74 °C. Die Kurve der NaCl-Lösung ist zu diesem Verlauf in y-Richtung zu höheren Ultraschallgeschwindigkeiten nahezu parallel verschoben. Sie erreicht ihr Maximum bereits bei ~72 °C. Die Werte der Maxima sind in Tabelle 10 aufgeführt. Dieses Beispiel bestätigt also Willards Hypothese, dass die Maxima zu niedrigeren Temperaturen verschoben sind. Der Unterschied der Messreihen zeigt sich auch in den Werten der Differenz (Gelb). Die Kurven nähern sich immer weiter an, je höher die Temperatur ist.

Tabelle 10: Messwerte der Maxima der Messreihen „DI“ (deionisiertes Wasser) und „Saline“ (4 % (m/m) NaCl-Lösung) im Vergleich.

Temperatur [°C]	DI [m/s]	Saline [m/s]
72,158	1.555,362	1.589,522
72,205	1.555,366	
72,253	1.555,370	
74,382	1.555,462	1.589,439
74,432		1.589,436

Ein Ziel der Arbeiten war die Untersuchung verschiedener Lösungen, um das Verhalten des Systems zu analysieren und gegebenenfalls zu optimieren. Dies war notwendig, um die Einsatzmöglichkeiten herauszufinden.

Deshalb wurden zunächst wässrige Salz-Lösungen für Messungen herangezogen. Salze sind leicht zu beschaffen, vergleichsweise kostengünstig und einfach in der Handhabung. Zudem ist ihr Einfluss auf die Ultraschallgeschwindigkeit der Abbildung 42 folgend schon bei geringen Konzentrationen signifikant. Sie sind zudem von biotechnologischer Bedeutung. Als Bestandteil von Puffern und Lösungen und, z. B. in der Aufreinigung, werden sie auf Grund ihrer Interaktionsfähigkeit mit Proteinen eingesetzt.

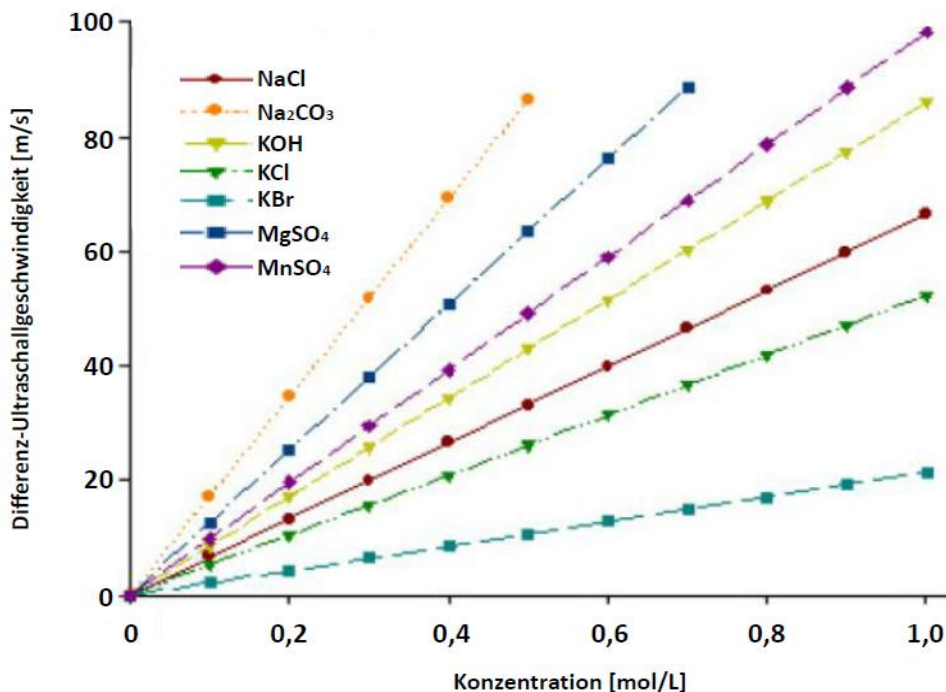


Abbildung 42: Beispielmessreihen zum Verhalten der Ultraschallgeschwindigkeit als Differenz zum Lösungsmittel Wasser verschieden konzentrierter Salz-Lösungen, nach ¹²⁵.

In Abbildung 42 sind dazu Messreihen mit unterschiedlich konzentrierten Salzlösungen gezeigt. Die Auswahl der Salze umfasst einfach und zweifach geladene Kationen sowie entsprechend geladene Anionen. Die Ionen variieren in Größe und Ladung.

Für diese wässrigen Lösungen werden nach Schaaffs (1951 & 1963) die Ionenladungen, mit ihren Feldwirkungen auf das Wasser, als entscheidende Ursache für die Zunahme der Ultraschallgeschwindigkeit genannt. Sie bewirken eine Abnahme der Kompressibilität mit steigender Konzentration¹³¹. Dies bewirkt dem Schema in Abbildung 32 folgend die Steigerung der Ultraschallgeschwindigkeit der wässrigen Lösung im Vergleich zum reinen Wasser.

Es wurden mit dem URT-System Salzkonzentrationsbestimmungen, ähnlich denen in Abbildung 42 gezeigt, durchgeführt. Hierbei wurde immer im Differenzmessverfahren gemessen und dabei die Messzelle 1 als Referenz, mit deionisiertem Wasser, verwendet. Jede Messung erfolgte in Dreifachbestimmung zur Ermittlung der Präzision. Die Durchführung erfolgte nach Anhang 6.3. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 43 dargestellt.

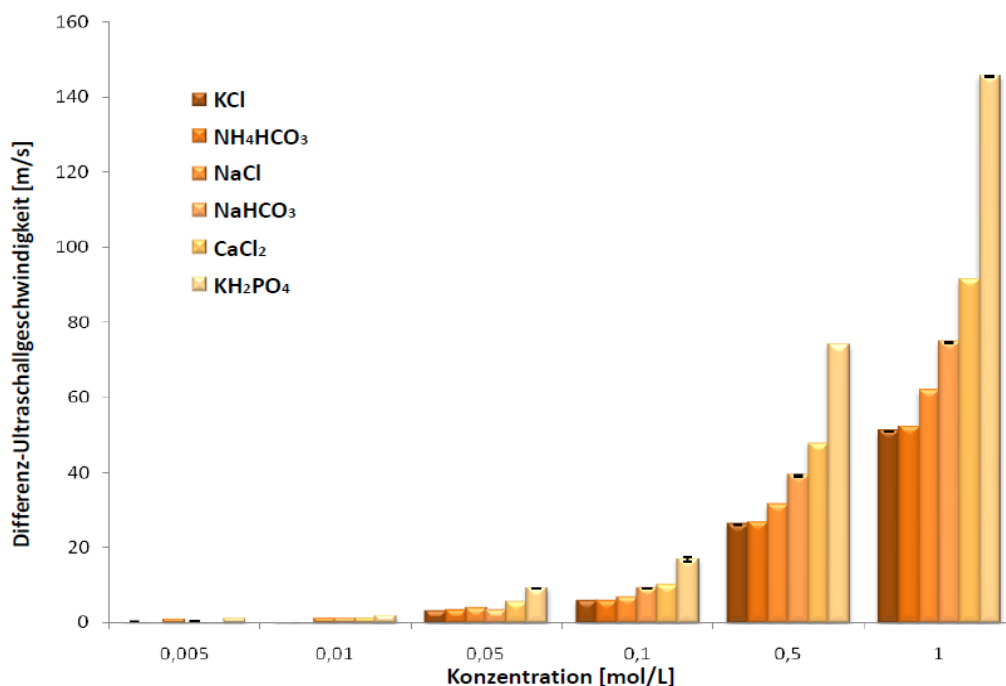


Abbildung 43: Die Änderung der Ultraschallgeschwindigkeit ist als Differenz zwischen deionisiertem Wasser und den wässrigen Lösungen ermittelt und als Funktion der Konzentration aufgetragen. Die Präzision ist auf Grund des Maßstabs nur punktuell im Graphen sichtbar.

Es wurden KCl, NH₄HCO₃, NaCl, NaHCO₃, CaCl₂ und KH₂PO₄ in Verdünnungsreihen zwischen 0,005 mol/L und 1 mol/L vermessen. Das Verhalten der

Messreihen bildet im Konzentrationsbereich bis 1 mol/L einen ansteigenden linearen Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit-Konzentration-Zusammenhang für die getesteten Salze. Die Einzelgraphen mit den entsprechenden Ausgleichsgeraden sind im Anhang 0 aufgeführt. Die Präzision der Messungen liegt auch im niedrigsten Konzentrationsbereich im Bereich von cm/s. Die aufgetragenen Fehlerindikatoren sind daher im Diagramm nicht sichtbar.

Beim Vergleich der Graphen wird deutlich, dass die Differenz-Ultraschallgeschwindigkeiten, und damit auch die Absolutwerte der Ultraschallgeschwindigkeit, stark von der Art des Salzes abhängig sind. Die Salze (respektive ihre Ionen) wirken sich unterschiedlich stark auf die „Struktur“ des Lösemittels Wasser aus. Die Kompressibilität und Dichte der Lösung ändert sich. Dabei spielen sowohl die Natur der Ionen als auch ihre Anzahl eine Rolle. Dreionige Salze, wie z. B. das Kalziumchlorid (CaCl_2), haben allein durch den größeren Teilchenanteil einen größeren Effekt als zweiionige Salze, z.B. Kaliumchlorid (KCl), wenn die Konzentration in Mol als Grundlage gewählt wird. Der Einfluss der einzelnen Ionen auf die Ultraschallgeschwindigkeit kann nur als Summe der Kationen- und Anioneneinflüsse gemessen werden. Dennoch können über die gewählten Salze ebenfalls Aussagen über einzelne Kationen- und Anionenspezies gemacht werden. Beim Vergleich der Messwerte für die 1 mol/L Lösungen lassen sich einige Schlüsse über den verhältnismäßigen Einfluss der getesteten Anionen und Kationen ziehen. In Abbildung 44 ist in der oberen Reihe der generelle Effekt der Salze auf die Ultraschallgeschwindigkeit vom „schwachen“ KCl zum „starken“ KH_2PO_4 aufgeführt.

Durch die Betrachtung unterschiedlicher Salze, die die gleichen Kationen oder Anionen enthalten, lässt sich der Effekt der Gegenionenspezies ins Verhältnis setzen. Bei den Anioneneinflüssen (I und II) lässt sich über die Beziehung in I das Chlorid-Anion als schwächerer Einfluss auf die Ultraschallgeschwindigkeit identifizieren als der des Dihydrogenphosphats. Ebenso zeigt der Vergleich in II, dass das Chlorid-Anion „schwächer“ ist als das Hydrogencarbonat. Durch die gewählten Salzbeispiele lässt sich jedoch keine Aussage über das Verhältnis vom Dihydrogenphosphat-Anion zum Hydrogencarbonat-Anion treffen.

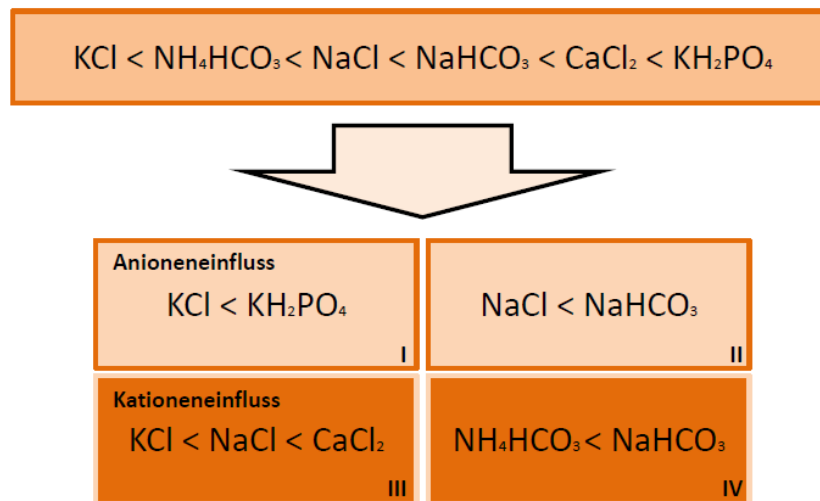


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Messung der 1 mol/L Salzlösungen aus Abbildung 42. Vergleich der Einflüsse der Kationen und Anionen auf die Ultraschallgeschwindigkeit.

Die Kationeneinflüsse (III und IV) zeigen, dass das Kalium-Kation einen schwächeren Einfluss ausübt als das Natrium-Kation (III). Die Abstufung zum Kalzium-Kation als stärkstes dieser drei lässt sich nicht quantifizieren, da der Einfluss des Chlorid-Anions hier doppelt gezählt werden müsste. Für eine qualitative Analyse fehlen exakte Werte. Aus IV ist das Ammonium-Kation als schwächer als das Natrium-Kation abzuleiten. Die Gründe für die beobachteten Unterschiede zwischen verschiedenen Beispiel Salz-Anionen werden unter 4.2.4.2 dem Punkt „Hofmeister-Reihe“ vertieft betrachtet.

Alle Messreihen bestätigen das erwartete Ergebnis, dass die Ultraschallgeschwindigkeit in wässrigen Lösungen bei Zugabe von Salzen, steigender Konzentration wie von Willard beschrieben, zunimmt.

4.2.4.1 Messungen im Durchfluss

Im Vergleich zu den mit dem statischen Gerät erhaltenen Daten, wurden Messreihen mit dem Durchflusssystem durchgeführt. Dazu wurden Verdünnungsreihen von KCl, NaCl und NaHCO₃ gemessen.

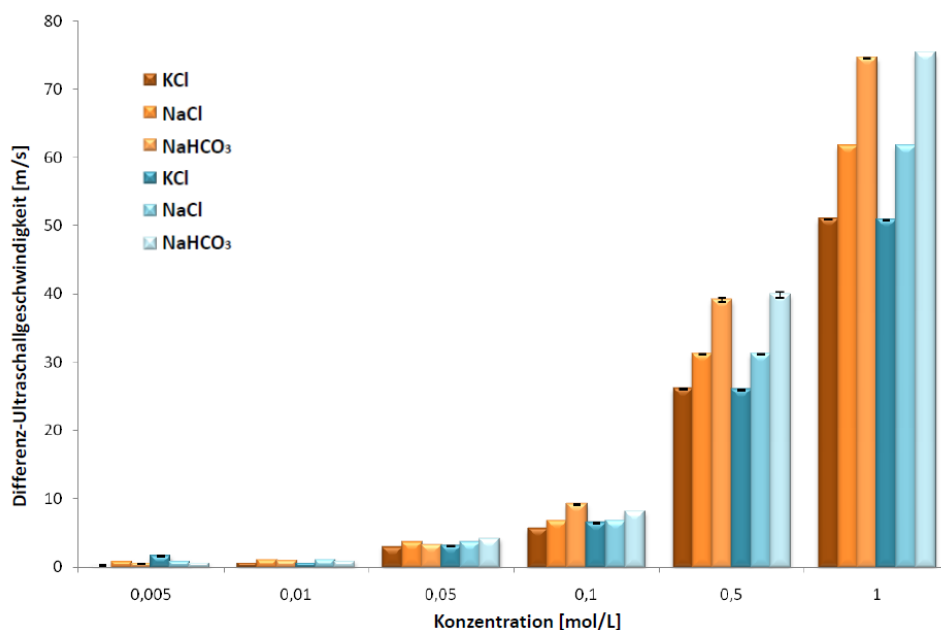


Abbildung 45: Orange kennzeichnet die Messreihen der statischen, das Blau die der Durchflussmessung.

Die Ergebnisse des Vergleichs der KCl-Messreihe im statischen Messgerät und dem Durchflussmessgerät wurde bereits unter 4.1.1 aufgeführt. Die Messung der Proben und die Präparation der Verdünnungsreihe erfolgten wie im Anhang 6 beschrieben. Die Salze wurden im Konzentrationsbereich von 0,005-1 mol/L gemessen. Die isotherme Messung der Verdünnungsreihen ergab die in Abbildung 45 gezeigte Graphik. Die Ultraschallgeschwindigkeit ist als Differenz gegen die Konzentration der Lösung aufgetragen. Die gezeigten Messergebnisse sind die Mittelwert der Messdatenreihen und ihre Präzision (siehe Anhang 6.3.6.1). Die Vergleichbarkeit der Daten lässt sich im Graphen erkennen und wird durch die Daten der Tabelle 11 gestützt.

Tabelle 11: Messwerte der statisch und in im Durchfluss gemessenen Salzreihen.

Salz	Konzentration [mol/L]	statisch [m/s]	Präzision	Durchfluss [m/s]	Präzision
KCl	0,005	0,182	0,018	0,154	0,071
	0,01	0,505	0,011	0,468	0,001
	0,05	2,858	0,015	3,084	0,093
	0,1	5,489	0,003	6,391	0,024
	0,5	26,040	0,016	25,878	0,132
	1	50,885	0,071	50,807	0,093
NaCl	0,005	0,367	0,002	0,721	0,005
	0,01	0,552	0,003	0,988	0,010
	0,05	3,058	0,027	3,536	0,002
	0,1	6,334	0,014	6,698	0,006
	0,5	30,538	0,018	31,147	0,003
	1	61,156	0,016	61,645	0,000
NaHCO ₃	0,005	0,438	0,008	0,403	0,000
	0,01	0,796	0,005	0,752	0,001
	0,05	3,230	0,014	4,106	0,005
	0,1	9,094	0,101	8,064	0,006
	0,5	39,055	0,314	39,844	0,389
	1	74,511	0,050	75,223	0,015

Die Messungen ergaben nahezu identische Werte für die Salze und bestätigten den erwarteten linear steigenden Verlauf der Ultraschallgeschwindigkeit mit Erhöhung der Konzentration bis 1 mol/L. Die Genauigkeit der angepassten Geraden (siehe Anhang 6.4) nimmt jedoch im Vergleich der statischen zu den Durchflussmessungen ab. Die Ultraschallgeschwindigkeiten schwanken stärker um ihren Mittelwert. Dies liegt vermutlich an der Temperaturstabilität des Durchflussverfahrens. Bei der luftgekühlten, statischen Messzelle werden Temperaturschwankungen bei der stationären Messzelle vermieden, indem vor Beginn der Messung auf Temperaturkonstanz gewartet wird. Beide Messzellen des statischen Geräts hatten somit dieselbe Temperatur. Das ursprüngliche Durchflussmessgerät (noch mit der Dosierpumpe betrieben) temperiert ebenfalls beide Messzellen parallel. Allerdings sind hier die Messzellen verschiedenen Bedingungen ausgesetzt. Messzelle 1 wird quasi-stationär betrieben, da sie nach einmaligem Befüllen nicht weiter durchströmt wird. Messzelle 2 ist die eigentliche Durchflusszelle und wird kontinuierlich mit der Messlösung durchströmt. Durch den Durchfluss der Probelösung kommt es zu Temperaturschwankungen und dabei auch zu

Temperaturunterschieden zwischen den beiden Messzellen. Durch die Verwendung von Messzelle 1 als Referenz zu Messzelle 2 schlägt sich jegliche so verursachte Änderung auf den bestimmten Differenzwert nieder. Die Abweichungen können ebenfalls auf Konzentrationsschwankungen zurückgeführt werden. Bei beiden Messgeräten kamen jedoch gleichpräparierte Proben zum Einsatz. Daher sind die bei den Folgegeräten kompensierten Temperaturschwankungen hier als Ursache zu benennen.

Durch den direkten Vergleich der Verdünnungsreihe in Abbildung 45 ist, wie schon in 4.1.1 beschrieben, die Übereinstimmung der Messdaten zu erkennen. Daraus leitete sich ab, dass das Durchflussmessgerät eine erfolgreiche Weiterentwicklung der stationären Messzelle ist und der Weiterentwicklung nichts entgegensteht. Die Messungen lieferten zudem Willards Hypothese entsprechende Werte. Ein Anstieg der Ultraschallgeschwindigkeit erfolgte mit steigender Salzkonzentration, unabhängig von der Art des Salzes. Die Bestimmung des Einflusses der Ionenstärke auf die Ultraschallgeschwindigkeit ist von Interesse. Für die spätere Anwendung des URT-Systems (Proteinmonitors) zur kontinuierlichen Überwachung des Faltungs- und Aggregationszustandes der Zielproteine sind während einer Aufreinigung die Strukturveränderungen durch Medienbestandteile und Prozess-einwirkungen und deren Einfluss auf die Ultraschallgeschwindigkeit von Bedeutung. Diese müssen auch für die spätere Entwicklung von Prozessmodellen, die für die Anpassung der Online-Auswertung verwendet werden, bekannt sein.

4.2.4.2 Hofmeister-Reihe

Besonders interessant für den Aufreinigungsbereich sind die Effekte der Salze auf die Proteine in Lösung. Es gibt zahlreiche Theorien darüber, welcher Mechanismus hinter dem Effekt des Aussalzens steht. „Aussalzen“ beschreibt das Auftreten der Ausfällungen (Präzipitationen) von Proteinen aus einer Lösung. Für das Lösungsverhalten eines Proteins ist die Beschaffenheit der Oberfläche des Moleküls verantwortlich. Auf ihr sind hydrophile und hydrophobe Gruppen angeordnet. Dass Lösen des Proteins in wässrigem Milieu ist die Folge von polaren Wechselwirkungen des Proteins mit dem Lösemittel Wasser. In Lösung kommt es zu ionischen Wechselwirkungen mit gelösten Salzen und elektrostatischen Abstoßungen zwischen gleichartig geladenen Molekülen. Die Lösungseigenschaften des Mediums Wasser können sich durch Änderung der Ionenstärke und des pH-Wertes auf

die Löslichkeit von Proteinen positiv oder negativ auswirken. Bei der Verminderung der Proteinlöslichkeit kommt es zur Ausfällung des Proteins. Das Aussalzen von Proteinen wird sogar zur Proteinreinigung eingesetzt. Häufig wird es als erster Aufreinigungsschritt der Proteingewinnung angewandt. Zwar wird keine signifikante Auftrennung erzielt, jedoch eine Aufkonzentrierung erreicht. Diese erleichtert die nachfolgenden Reinigungsschritte. Wichtig ist dabei, dass die Fällung reversibel erfolgt und das Protein in seine native Struktur zurück überführt werden kann. Nur native und somit aktive Proteine sind von hoher Wertigkeit^{132, 133}.

Der Mechanismus des Aussalzens beruht darauf, dass Wassermoleküle auch die hydrophoben Stellen des gelösten Proteins umhüllen. Gelöste Salze konkurrieren mit ihnen um diese Hydrathülle. Steigt die Salzkonzentration über eine bestimmte Grenze, ist das verfügbare Wasser für das Protein nicht mehr ausreichend. Die hydrophoben Seitenketten sind freigelegt und interagieren mit freien hydrophoben Stellen anderer Moleküle. Dadurch kommt es zur Aggregatbildung, was letztlich die Ausfällung des Gesamtproteins bewirkt. Wie viel Salz nötig ist, um das Aussalzen auszulösen, ist von der relativen Löslichkeit des Proteins im gewählten Lösemittel abhängig. Sie ist gekoppelt an die Oberflächenhydrophobizität des Proteins. Ein Protein mit einer geringen Anzahl von hydrophoben Gruppen auf der Oberfläche ist z. B. besser in wässrigen Lösungen löslich und kann mit einer größeren Salzkonzentration um das Hydratwasser konkurrieren¹³².

Entscheidend für das Aussalzen ist zusätzlich das eingesetzte Salz. Durch das Hart-Weich-Prinzip lassen sich Ionen nach ihren Eigenschaften unterscheiden. Entsprechend dazu interpretiert Schaaf die Feldstärke der Ionen und leitet daraus ihre Eigenschaften ab¹³⁴. Harte Ionen sind klein und besitzen eine dazu relativ hohe Ladung. Harte Ionen gehen stärkere Bindungen mit dem Lösungsmittel Wasser ein. Dadurch stehen sie mit den Proteinen in stärkerer Konkurrenz um die Wassermoleküle als weiche Ionen. Die Anzahl der Wassermoleküle in der Hydrathülle von Ionen variiert dabei ebenfalls in Abhängigkeit von Ladung und Größe der Ionen¹³⁵. Speziell für die Wechselwirkungen, die Salze in wässrigen Proteinlösungen verursachen, gibt es nach Hofmeister eine Einteilung der Salze. In dieser sogenannten Hofmeister-Reihe werden die Ionen der Salze abgestuft in chaotrop und kosmotrop eingeteilt. Abbildung 46 zeigt dazu ein Einfluss-Schema^{132, 136}.

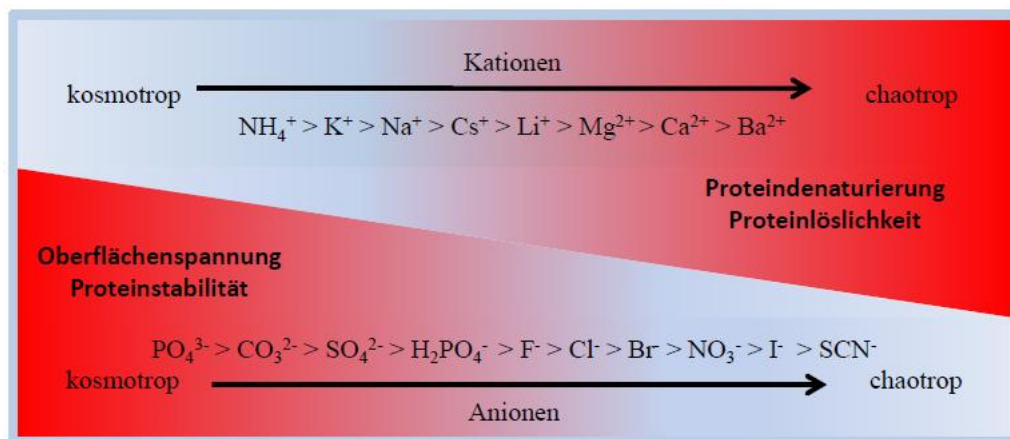


Abbildung 46: Schematische Darstellung einer Auswahl an Kationen und Anionen geordnet nach ihren chaotropen und kosmotropen Eigenschaften, nach ^{132, 137}.

Die links stehenden kosmotropen (antichaotropen) Salze vergrößern hydrophobe Wechselwirkungen. Sie sorgen damit für eine Erhöhung der Proteinstabilität und sind besonders schonende Fällungsmittel. Die chaotropen Salze hingegen erhöhen die Proteinlöslichkeit und führen zur Proteindenaturierung, was die Proteinstruktur irreversibel schädigt. Die gezeigte Hofmeister-Reihe enthält beispielhaft häufig verwendete Ionen ^{138, 139}. Generell lassen sich aus der Größe und der Ladung eines Ions, seiner effektiven Oberflächenladung, die Effekte auf Proteine ableiten. Die Wirkung eines Salzes setzt sich dabei additiv aus den Eigenschaften der Ionen zusammen. An der aufgeführten Einteilung lässt sich z. B. ablesen, dass Ammoniumsulfat, das sowohl im Kationen- als auch Anionenanteil kosmotrop ist, als Fällungsreagenz geeignet ist. Tatsächlich vereint es noch andere Eigenschaften, wie die leichte Abtrennbarkeit durch Dialyse oder Ionenaustausch, die es für diesen Einsatz prädestinieren ¹³². Die Ausfällung eines Proteins verändert die Konzentration der Lösung und ist somit messbar. Ziel des Proteinmonitors ist es Veränderungen am Zielprotein vor einsetzender Denaturierung und Ausfällung zu detektieren. Dazu wurden zunächst Messungen mit verschiedenen Salzen mit gleichem Kation durchgeführt. Das Ergebnis der Ultraschallmessung lässt sich so den Anionen der Hofmeister-Reihe entsprechend zuordnen. Der genaue Effekt der Ionen ist nicht entschlüsselt. Ähnlich dem angesprochenen Hart-Weich-Prinzip, das einen Teil des Verhaltens sehr treffend beschreibbar macht, sind andere Theorien zu prüfen, bzw. nur für Teilbeobachtungen als Theorie tragfähig. Eine wiederkehrende Erklärung ist der postulierte Einfluss der Ionen auf das umgebende Wasser (bulk water) über die Hydrathülle hinaus. Dies wurde durch

Untersuchungen von Omta (2003)¹⁴⁰ zwar zunächst widerlegt, Koga (2004)¹³⁵ beschreibt jedoch in seiner Versuchsreihe von verschiedenen Natriumsalzen wiederum einen komplexen Einfluss auf das umgebende Wasser. Er vermutete, dass eine größere Anzahl an Parametern nötig ist, um den Effekt der Hofmeisterreihe aufzuklären.

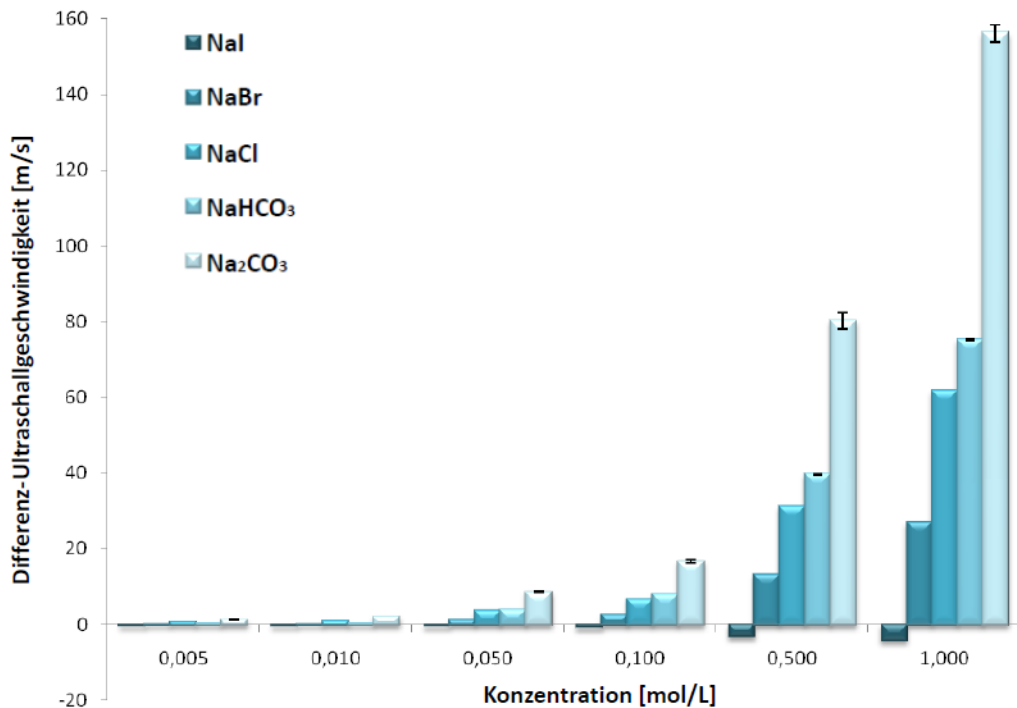


Abbildung 47: Werte der Durchflussmessung der Ultraschallgeschwindigkeitsdifferenzen verschiedener Natriumsalze im Vergleich zur Hofmeisterreihe.

Vor diesem Hintergrund wurden Messungen der Ultraschallgeschwindigkeit verschiedener Natriumsalzlösungen durchgeführt. Der Effekt der Anionen sollte dabei den Ausschlag über die Unterschiede im Verhalten geben. Gemessen wurden Lösungen von NaI, NaBr, NaCl, NaHCO₃ und Na₂CO₃ im Konzentrationsbereich von 0,005-1 mol/L dem Protokoll im Anhang 6.3 entsprechend in Zweifachbestimmung. Die Ergebnisse sind dem Graphen in Abbildung 47 zu entnehmen.

Die Salzreihen verhalten sich der Hofmeisterreihe entsprechend. Das Natriumiodid hat den geringsten Einfluss auf die Ultraschallgeschwindigkeit. Dieser erhöht sich vom Natriumbromid zum Natriumchlorid. Die mehrionigen Salze zeigen den größten Einfluss. Doch auch hier gilt, dass der Effekt von zwei Natriumkationen größer ist, als der von einem Natriumkation mit einem Hydroniumion. Das

Hydroniumion wird nach Hofmeister als kosmotroper als das Natriumkation eingestuft. In der wässrigen Lösung scheint das Hydroniumion zudem nicht so stark ins Gewicht zu fallen, was die Auswirkung auf die Ultraschallgeschwindigkeit betrifft. Auch als Hydrogencarbonat-Anion betrachtet ist es laut Hofmeister schwächer als das Carbonat-Anion¹³⁸. Der Sprung zwischen Natriumhydrogencarbonat zum Natriumcarbonat ist signifikant. Aus den Beobachtungen lässt sich insgesamt eine Steigerung der Ultraschallgeschwindigkeit mit steigender Chaotropie ableiten.

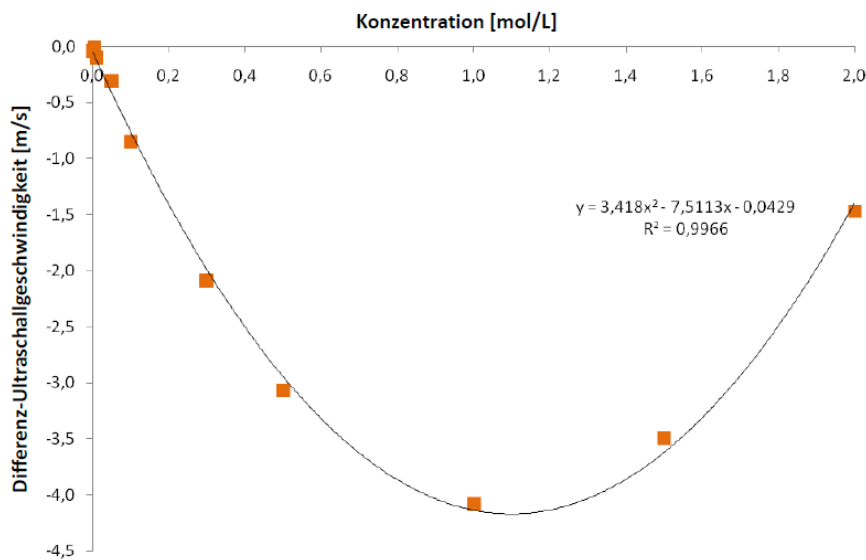


Abbildung 48: Konzentrations-Differenz-Ultraschallgeschwindigkeits-Verlauf einer Natriumiodid Messung bis 2 mol/L in der statischen Messzelle.

Ein dennoch interessantes Verhalten bewirkt das Natriumiodid. In Abbildung 47 ist zu sehen, dass die Ultraschallgeschwindigkeit im Bereich bis 1 mol/L nicht zu-, sondern abnimmt. Dazu sind die Messdaten einer erweiterten Messreihe von Natriumiodid in Abbildung 48 gezeigt. Es fällt nicht nur das nicht-lineare Verhalten des Konzentrations-Differenz-Ultraschallgeschwindigkeits-Zusammenhangs auf. Die Linearität gilt so auch für andere Salze bzw. Substrate nur im niedermolekularen Konzentrationsbereich. Die Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit erreicht ihr Minimum bei einer Konzentration von ~1 mol/L, danach steigt sie wieder an. Die gezeigten Messdaten lassen nur vermuten, dass die Differenz bei weiter steigender Konzentration auch den positiven Bereich erreicht. In Tabelle 12 sind die Messdaten aufgeführt.

Tabelle 12: Messwerte der Bestimmung der Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit des Natriumiodid im Konzentrationsbereich von 0,001-2 mol/L.

Konzentration [mol/L]	Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit [m/s]	Präzision [m/s]
0,001	-0,040	0,018
0,005	-0,005	0,031
0,010	-0,097	0,019
0,050	-0,310	0,014
0,100	-0,852	0,014
0,300	-2,084	0,012
0,500	-3,067	0,003
1,000	-4,082	0,012
1,500	-3,494	0,015
2,000	-1,467	0,024

Das generell beobachtete Verhalten war zu erwarten. Die Zugabe von Salzen zu Wasser erhöht die Dichte. Dazu kommt bei Salzen die Ausbildung von Hydrathüllen, durch die die Dichte schneller ansteigt, da sie das Volumen steigern. Im Bereich der Hydrathülle ist die adiabatische Kompressibilität im Vergleich zum umgebenden freien Wasser erniedrigt. Beide Effekte wirken sich auf die Ultraschallgeschwindigkeit steigernd aus, sind lediglich verschieden stark ausgeprägt.

Für die Erklärung des Natriumiodid-Einflusses muss es demnach entscheidende Unterschiede zu den anderen Salzen geben. Um erneut die Hart-Weich-Betrachtung zu bemühen, ist Iodid als weiches Anion klassifiziert. Der Einfluss auf das „harte“ Lösungsmittel Wasser ist dem entsprechend schwach. Die Ausgebildete Hydrathülle erhöht die Dichte der Lösung nicht im entsprechenden Maße, indem die Kompressibilität ebenfalls erhöht wird. Der vom Natrium-Kation verursachte Effekt, die Erhöhung der Dichte, wird vom Iodid-Anion verursachten Effekt übertroffen. Dies ist nach Abbildung 32 das einzig mögliche Erklärungsmodell, da durch die Zugabe eines Salzes nicht die Dichte erniedrigt werden kann. Die Erhöhung der Kompressibilität muss auf einer Veränderung der Struktur des Wassers, einer Art Aufweiten der Abstände durch die Salzionen, hier die Iodid-Anionen, verursacht werden. Dadurch nimmt die adiabatische Kompressibilität ab und die Ultraschallgeschwindigkeit zu. Das Natriumiodid geht als Natrium-Kationen, die eine Hydrathülle ausbilden, und Iodid-Anionen, die nur eine schwach ausgeprägte Hydrathülle bilden, in Lösung. Bei geringen Konzentrationen gleichen sich die Effekte nicht aus. Die Iodid-Anionen stören die Ordnung, da sie sehr groß sind und nur eine dünne Hydrathülle ausbilden, jedoch noch zu

gering konzentriert sind, um miteinander wechselwirken zu können. In der Summe nimmt die Ordnung bei Konzentrationen unter 1 mol/L ab, die adiabatische Kompressibilität zu und die Ultraschallgeschwindigkeit folglich ab.

Zusammenfassend wird der Effekt auf die Ultraschallgeschwindigkeit von den gebildeten Hydrathüllen stark beeinflusst. Dieses Verhalten stimmt mit der Einteilung in der Hofmeisterreihe überein. Je kosmotroper das Ion ist, desto dicker ist seine Hydrathülle und desto schneller steigt die Ultraschallgeschwindigkeit an. Eine Prognose der Änderung in der Ultraschallgeschwindigkeit ist auf dieser Basis generell möglich.

4.2.5 Proteinanalyse mittels Ultraschall

Proteine und die durch sie verursachte Änderung in der Ultraschallgeschwindigkeit eines wässrigen Mediums stehen in diesem Abschnitt im Mittelpunkt. Am Beispiel des Aussalzens wurde bereits ein Phänomen der Salz-Protein-Interaktion in Lösung beschrieben. Dabei wurde ihre Oberflächenhydrophobizität angesprochen, die sich aus dem Anteil an hydrophoben Gruppen an der Oberfläche des Proteins im Verhältnis zur Gesamtoberfläche ergibt.

In Abbildung 49 ist dazu schematisch der Aufbau eines Proteins gezeigt. Es wurde schon mehrfach die Faltung von Proteinen angesprochen. Sie bedingt die räumliche Struktur des Proteins und auch seine Funktion. Dass die Funktion die Proteine als Produkt interessant macht, steht außer Frage. Die verschiedenen Faltungszustände eines Proteins sind für und während der Aufreinigung von Proteinen hilfreich bzw. unumgänglich.

Die Einflüsse, die die Löslichkeit bedingen, haben einen Einfluss auf die Dichte und adiabatische Kompressibilität der Lösung. Für die Ultraschallgeschwindigkeitsanalyse sind alle Wechselwirkungen zwischen Lösemittel und Protein entscheidend. Dazu zählen auch Einschlüsse vom Lösemittel Wasser in Taschen, die durch die Faltung des Proteins entstanden sind.

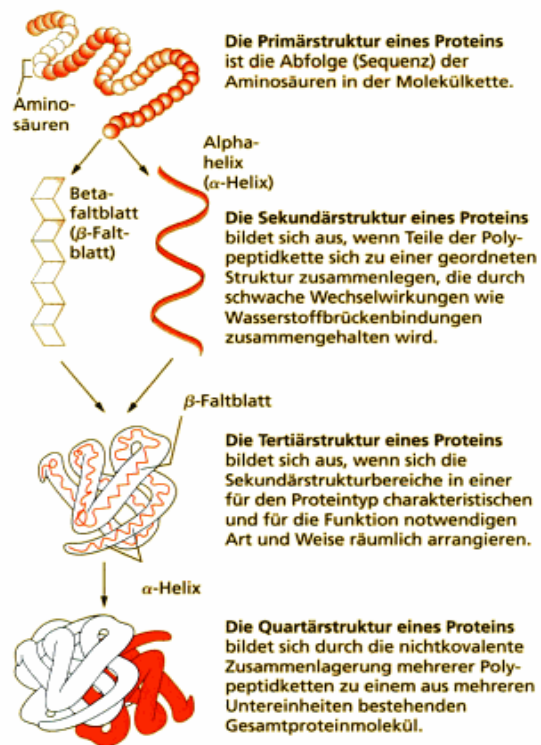


Abbildung 49: Schematische Darstellung der vier Ebenen der Struktur von Proteinen ⁷.

Die Genauigkeit und das Auflösungsvermögen der Ultraschallmessung sind abhängig von den Teilcheneigenschaften. Im Falle von Proteinen sind besonders die Molekülgröße, die Molekülfaltung und die Außenladung für die Unterschiede in der Ultraschallgeschwindigkeit verantwortlich. Sie machen Proteine dadurch unterscheidbar. Für die Versuchsreihen wurden daher verschiedene Proteine herangezogen. Auf die Untersuchungen mit RNase A, α -Chymotrypsin und Lysozym wird im folgenden Abschnitt eingegangen. In den Kapitel 4.2.6 und 4.2.7 werden zwei Proteinsysteme und der Einsatz des Proteinmonitors als Analyseinstrument erörtert.

4.2.5.1 Untersuchung der Modellproteine RNase A, α -Chymotrypsin und Lysozym mittels Ultraschall

Die drei vorgestellten Modellproteine wurden aufgrund ihrer Unterschiede in Größe und Eigenschaften und der guten Zugänglichkeit gewählt.

RNase A:

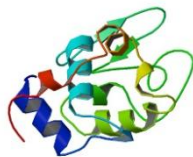


141, 142

Größe: 13,7 kDa ¹⁴³
pI: 9,6 ¹⁴³

=> 1967 wurde Ribonuklease A als eins der ersten Biomoleküle strukturell aufgeklärt ¹⁴⁴. Sie spaltet Phosphodiesterbindungen an der 5'-Position der Ribose nach Pyrimidine U und C einzelsträngiger RNA. Als Bestandteil des Schweißes dient sie dem Abwehrmechanismen des Körpers durch den Abbau von RNA-Viren.

Lysozym:



142, 145

Größe: 14,307 kDa ¹⁴³
pI: 11,35 ¹⁴³

=> Lysozyme sind Bestandteil des Immunsystems bei Tieren. Sie werden auch in Pflanzen, Pilzen, Bakterien und bei Bakteriophagen gefunden ¹⁴⁶. Lysozym ist ein Enzym, das β -1,4-glykosidische Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure- (NAM) und N-Acetylglucosaminresten (NAG) in Peptidoglykanen (aus Zuckerderivaten und Peptiden aufgebauten Makromolekülen) hydrolysiert. Es wird häufig aus dem Eiklar von Hühnereiern gewonnen. Als Konservierungsmittel ist Lysozym in der EU als Lebensmittelzusatzstoff der Nummer E 1105 zugelassen ^{147, 148}. In der Biotechnologie wird Lysozym zum Aufschluss von Bakterienzellen eingesetzt.

α -Chymotrypsin:



142, 149

Größe: 25 kDa ^{143, 150}
pI: 8,75 ¹⁴³

=> α -Chymotrypsin ist ein Enzym, das von der Bauchspeicheldrüse produziert wird und eine wichtige Funktion bei der Verdauung von Eiweißen einnimmt. Es gehört zur Familie der Serin-Proteasen und katalysiert die Hydrolyse von Proteinen bzw. Peptiden. Es ist aus drei Polypeptidketten, die durch Disulfid-Brücken verbunden sind, aufgebaut. Seine Struktur besteht aus mehreren antiparallelen β -Faltblatt-Regionen mit Helix-Anteilen. Bis auf die drei Reste Asp102, His57 und Ser195, die bei der Katalyse an der Spaltung der Peptidbindung beteiligt sind, liegen die geladenen Gruppen auf der Oberfläche des Moleküls ¹⁵¹.

Abbildung 50: Daten zu den verwendeten Proteinen RNase A, Lysozym und α -Chymotrypsin.

Die Ultraschallgeschwindigkeit ist abhängig von der Konzentration der angesetzten Lösungen. Dabei ist die Konzentration des Proteins im Downstreamprocessing üblicherweise um ein Vielfaches geringer als die der anderen Solventien (z. B. Salze). Für die Versuche im Labormaßstab wurden daher die Proteinlösungen in Gewichtsprozent (% (m/m)) an Protein angesetzt und nicht äquimolar. Zudem sind die Mengen, die eine 1 mol/L konzentrierte Lösung an Protein enthalten müsste, unwirtschaftlich und für die Versuchsreihen nicht notwendig.

4.2.5.2 Bestimmung der Nachweisgrenze (NWG) für die Modellproteine

Je größeren Einfluss ein Protein auf die Kompressibilität und Dichte der Lösung ausübt, umso feiner lässt es sich durch den Ultraschall nachweisen. Das heißt allerdings auch, dass Proteine mit nur geringem Einfluss mit schlechterer Auflösung (Nachweisgrenze bei höherer Konzentration) nachweisbar sind. Um dies zu testen, wurden zunächst Kalibrationen der vorgestellten Modellproteine angefertigt. Dazu wurden Verdünnungsreihen der Proteine RNase A, α -Chymotrypsin und Lysozym mit dem stationären Messgerät gemäß der Versuchsbeschreibung im Anhang 6.3.3 in Dreifachbestimmungen vermessen. Um die Proteine dabei zu schonen, wurden sie dabei in entsprechend physiologischen Puffern gelöst und gegen diese als Referenz vermessen.

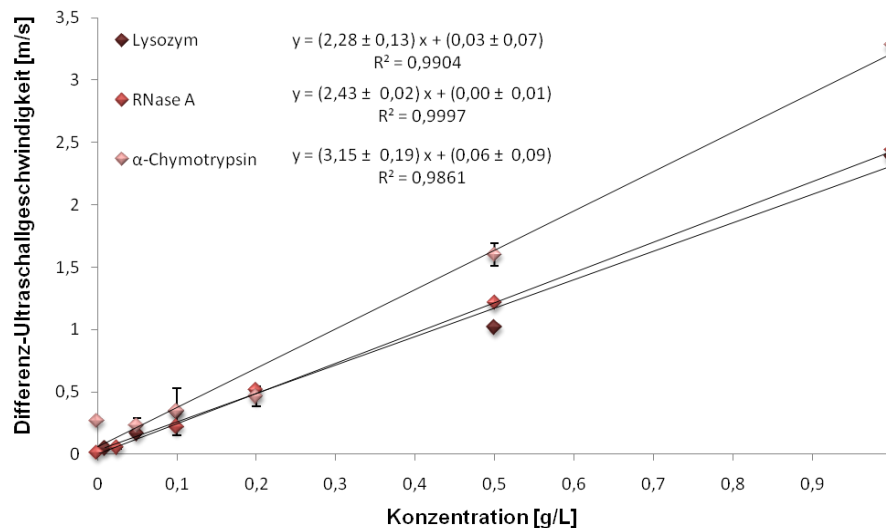


Abbildung 51: Messwerte der Kalibrationen für die Modellproteine zur Berechnung der unteren NWG. Die eingesetzten Puffer sind Tabelle 13 zu entnehmen.

Die untere NWG in Tabelle 13 wurden über die im Anhang 6.3.6.2 gegebenen Formeln bestimmt. Die in Abbildung 51 gezeigten Kalibrationen bilden die Grundlage der Berechnungen. Die Messsignale liegen bei einer Konzentration von 0,5 % (m/m) angemessen über dem Wert der NWG, so dass auch kleinere Schwankungen durch Konformationsänderungen beobachtbar sein sollten. Zudem ist die dadurch eingesetzte Menge an Protein praktikabel im Umgang. Daher wurden nachfolgend die Proteinmessungen meist mit einem Proteinanteil von 0,5 % (m/m) durchgeführt.

Tabelle 13: Nachweisgrenzen (NWG) der untersuchten Modelproteine.

Protein	Puffer	NWG Konzentration [g/L]/[mol/L]
RNase A	Kalium-Phosphat-Puffer pH 5,5; 10 mmol/L	0,01 / 8,76E-06
Lysozym	Citrat-Puffer pH 3; 50 mmol/L	0,12 / 8,39E-06
α -Chymotrypsin	Kalium-Phosphat-Puffer pH 5,96; 50 mmol/L	0,12 / 4,80E-06

Das Auflösungsvermögen von hochauflösenden UV/Vis- und Fluoreszenzmessungen liegt für Proteine bei einer Konzentration von 10^{-8} mol/L^{132, 152}. Im Vergleich zur Ultraschall-Resonator-Technologie ist es damit im Moment um den Faktor 10 präziser. Die Hauptaufgabe des Proteinmonitors soll jedoch nicht die Konzentrations-, sondern die Konformationsanalyse bilden. Die Leistungsfähigkeit in diesem Feld wird im nächsten Punkt betrachtet.

Eine Schwierigkeit der Kalibration bildet die mögliche Änderung der Proteinkonformation. Die Proteine können sich zwischen den Messungen aufgrund von Temperatur- oder pH-Schwankungen umfalten. Das Arbeiten bei Raumtemperatur (RT) ist für Proteine in Lösung schon ausreichender thermischer Stress.

4.2.5.3 Konformationsänderungen

Um gezielt Änderungen in der Konformation beobachten zu können, wurden die Proteine daher verschiedenen Stressbedingungen ausgesetzt. Begonnen wurde mit verschiedenen Cosolventien. Die Cosolvens-Effekte sind dabei, wie es auch beim Aussalzen beschrieben wurde, verschieden stark ausgeprägt.

4.2.5.3.1 Untersuchung des Einflusses verschiedener Zusätze (Cosolventien)

Ein Beispiel für ein die Proteinstruktur nicht beeinflussendes Cosolvens ist das Kaliumsulfat, welches bei der in Abbildung 52 gezeigten Messreihe mit RNase A und Lysozym zum Einsatz kam. Der Nachweis eines 0,5 % (m/m) Proteinanteils ist, mit einer Differenz im Ultraschallsignal von 1,2 m/s bzw. 1,4 m/s, vor dem Hintergrund einer bis zu 60 m/s-Differenz verursachenden Salzlösung, reproduzierbar möglich.

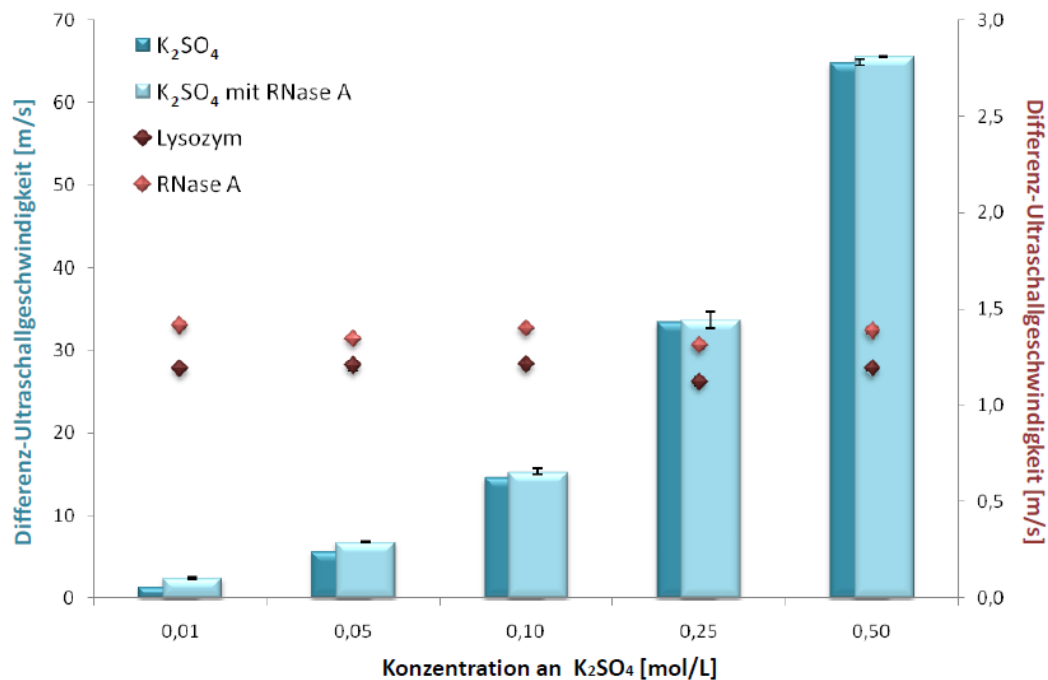


Abbildung 52: Messung von RNase A- und Lysozym-Proben mit unterschiedlichen Anteilen Kaliumsulfat. Die Proteine wurden in einer Konzentration von 0,5 % (m/m) vorgelegt. Die Präzision ist so gering, dass sie beim gewählten Maßstab nur teilweise abgebildet wurde. Die Messungen wurden in Kalium-Phosphat-Puffer (pH 5,5; 10mmol/L) durchgeführt.

Die blauen Säulen zeigen die gemessenen Differenzwerte von Kaliumsulfat-Lösung gegen Puffer (K_2SO_4) und Kaliumsulfat-Lösung mit RNase A-Anteil gegen Puffer (K_2SO_4 mit RNase A). Sie beziehen sich auf die linke Ordinate. Die roten Rauten zeigen den Differenzwert der Proben von Kaliumsulfat-Lösung ohne Protein zu denen mit Protein an. Die Werte werden an der rechten Ordinate angezeigt. Kaliumsulfat ist nicht als stark strukturveränderndes Cosolvens bekannt. Dies lässt sich an den konstanten Differenzwerten in der Ultraschallgeschwindigkeit

keit, ohne Tendenz im Zusammenhang mit der ansteigenden Salzkonzentration, bestätigen. Die Salzkonzentrationen liegen zwischen 0,01-0,5 mol/L. Bei höher konzentrierten Proben ist jedoch von keinem abweichenden Verhalten auszugehen. Der Effekt des Aussalzens sollte bewusst vermieden werden.

Es wurden Untersuchungen zum Proteinverhalten bei steigender Ethanol- und Harnstoff-Konzentration durchgeführt. Beide Stoffe sind für ihren Einfluss auf Proteine in Lösung bekannt. Die folgenden Graphen in Abbildung 53 und Abbildung 54 entsprechen in ihrer Beschriftung dem Schema des Graphen der Messung des Kaliumsulfateinflusses.

Ethanol ist ein polares Lösemittel, das gut mit Wasser mischbar ist. Es erniedrigt jedoch beim Mischen mit Wasser dessen Polarität. Besonders Proteine mit einer hohen Oberflächenladung reagieren auf eine Zugabe von Ethanol und die damit verbundene erniedrigte Polarität mit einer Verschlechterung ihrer Löslichkeit.

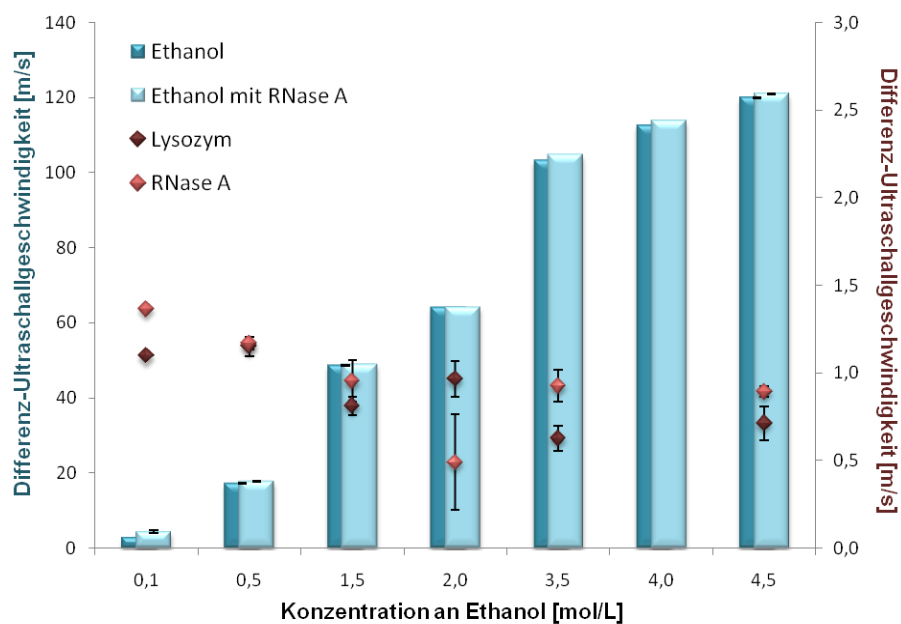


Abbildung 53: Messung des Einflusses von Ethanol in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Proteine Lysozym und RNase A. Die Messungen wurden in Phosphat-Puffer (pH 5,5; 10mmol/L) durchgeführt.

Die in Abbildung 53 gezeigten Messdaten belegen, dass die beiden Proteine schon bei geringen Ethanol-Konzentrationen auf diesen Zusatz reagieren. In der Tendenz

ist eine Abnahme des Protein-Ultraschallsignals mit steigender Ethanol-Konzentration zu beobachten. Die eingesetzten Konzentrationen von 0,1-4,5 mol/L Ethanol sind dabei für das Downstreamprocessing untypisch hoch gewählt, um eine Reaktion der Proteine zu erzwingen.

Harnstoff ist aus der Literatur als zuverlässiges Denaturierungsreagenz bekannt. Wiederum proteinabhängig, reichen teils schon geringe Konzentrationen um z. B. die Inaktivierung eines Enzyms zu erreichen¹⁵³⁻¹⁵⁷. Die beiden Beispielpoteine Lysozym und RNase A wurden daher Konzentrationen von 0,1-3,5 mol/L Harnstoff ausgesetzt.

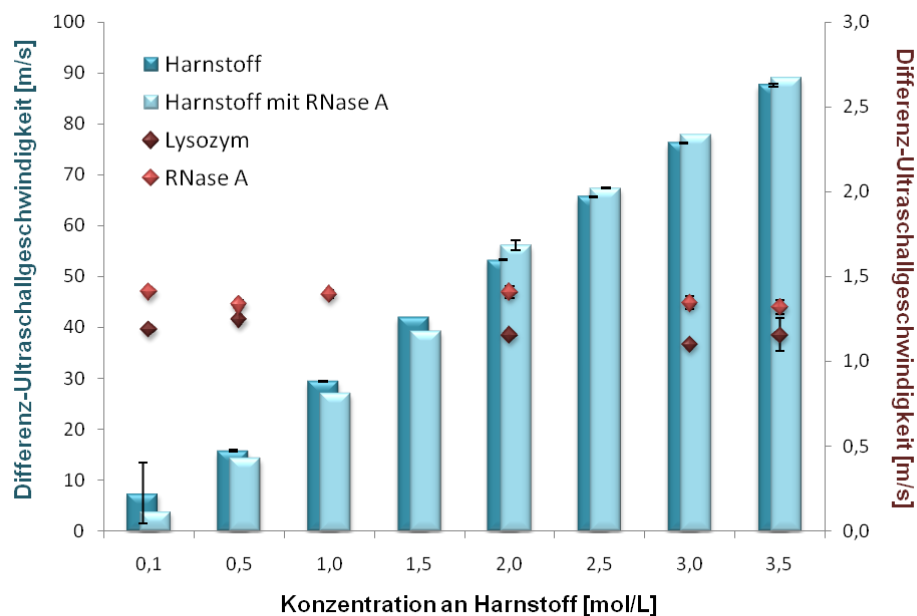


Abbildung 54: Einfluss von Harnstoff-Lösung verschiedener Konzentration auf die Protein-signale in der Ultraschallmessung. Die Messungen wurden in Phosphat-Puffer (pH 5,5; 10mmol/L) durchgeführt.

Die erhaltenen Daten in Abbildung 54 zeigen den erhofften Effekt der Denaturierung nicht stark ausgeprägt. Es ist eine leichte Abnahme im Ultraschallsignal mit steigender Harnstoff-Konzentration zu beobachten. Im Anhang 6.4.2 ist ein Graph mit Lysozym und Ovalbumin als Modellproteine gezeigt. Die getesteten Harnstoff-Konzentrationen bewegten sich zwischen 0,1-12 mol/L Harnstoff. Dieser Graph zeigt einen weitaus größeren Einfluss des Harnstoffs. Die Denaturierung mit Harnstoff wird im Kapitel 4.2.5.4.1 thematisiert.

4.2.5.3.2 Temperaturdenaturierung

Durch Temperaturerhöhung kann die Denaturierung von Proteinen ausgelöst oder beschleunigt werden. Die Denaturierungstemperatur ist dabei je nach Protein verschieden. Am Beispiel von Lysozym ist in Abbildung 55 der Temperatur-Ultraschallgeschwindigkeits-Zusammenhang gezeigt.

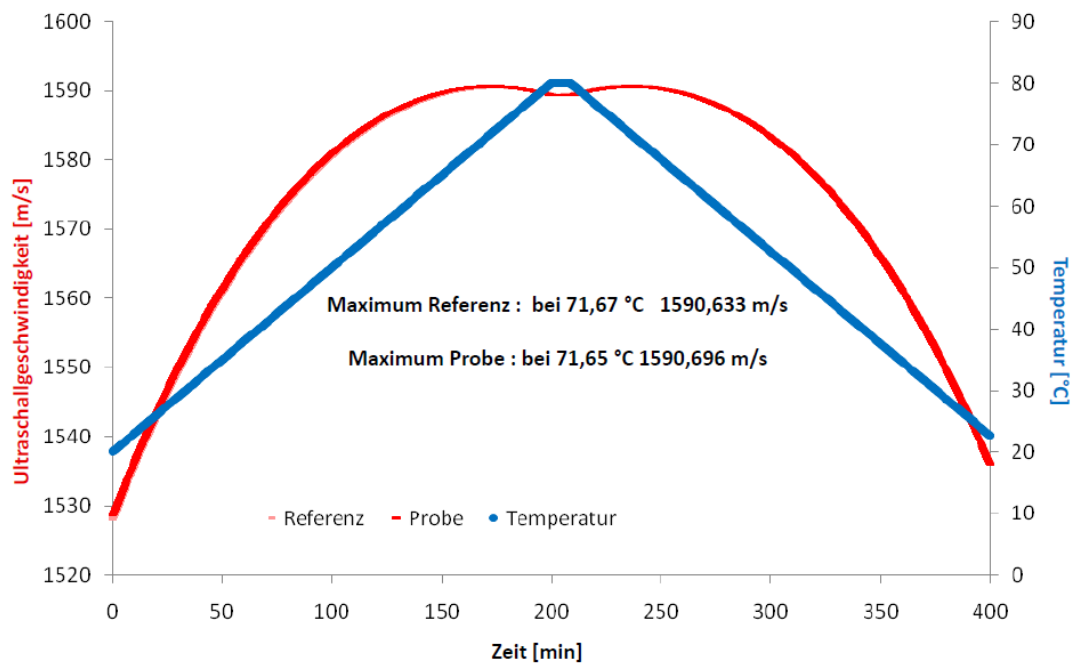


Abbildung 55: Die Probe mit 0,5 %(m/m) Lysozym wurden parallel zu einer Referenzprobe auf 80 °C erhitzt und anschließend abgekühlt. Der Graph zeigt, dass das Maximum bei beiden Kurven (Referenz und Probe) vor dem Erreichen der Endtemperatur überschritten wurde.

Im Graphen sind die Maxima der Kurven der Referenz (4 % ige NaCl-Lösung) und der Probe aufgeführt. Auch hier lässt sich beobachten, dass das Maximum der Probe nach links verschoben ist. Willards Hypothese wird, wie schon durch die Messungen der Salzproben, bestätigt. Die Erhöhung der Konzentration um 0,5 %(m/m) Lysozym stellt allerdings einen wesentlich kleineren Eingriff dar, als dies bei den Salzproben gezeigt wurde. Daher ist die Lage des Maximums, fast unmerklich, um 0,02 °C von 71,67 °C auf 71,65 °C verschoben. Bei einer Temperaturbestimmung, die beim URT-System auf ein tausendstel Grad genau erfolgt, ist diese Änderung jedoch detektier- und interpretierbar.

Der Vergleich der Verläufe der Referenz und Probe durch die Differenzbildung ist in Abbildung 56 dargestellt. Die Kurven nähern sich mit steigender Temperatur an, wie es durch die verschobenen Maxima zu erwarten ist. Bei 70 °C ist allerdings ein Abknicken der Differenzkurve zu sehen. Solche plötzlichen Änderungen, die auch durch das Abkühlen nicht abgefangen werden, deuten auf eine drastische Änderung der Probe hin. Über das Temperaturverhalten von Lysozym ist bekannt, dass es bis zu einer Temperatur von 70 °C¹⁵⁸ stabil ist. Das Ultraschall-Signal zeigt folglich dazu passend die irreversible Hitze-Agglomeration bzw. Denaturierung des Lysozyms.

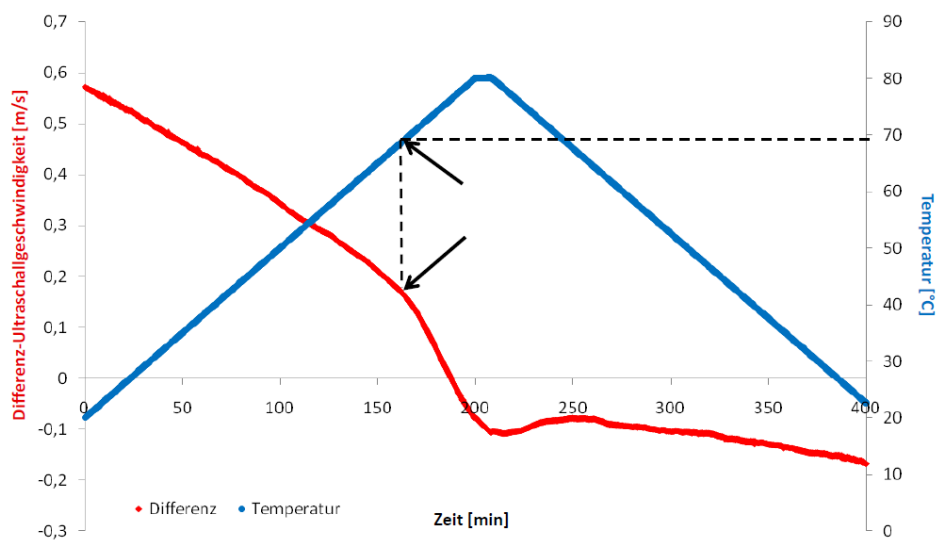


Abbildung 56: Verlauf der Kurve der Probe mit 0,5 % (m/m) Lysozym. In rot ist die Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit gezeigt. Die Kurve erfährt bei ca. 70 °C einen scharfen Knick. Die Temperatur ist in blau dargestellt. Die Proteinprobe wurde in keinem speziell physiologischen Puffer vermessen. Die irreversible Denaturierung zeigt sich in dem anhaltend abgesunkenem Signal.

Im Anhang 6.4.2.2 ist ein weiteres Beispiel für Temperaturdenaturierung mit dem Beispielprotein α -Chymotrypsin gegeben, dass ein entsprechendes Verhalten zeigt.

Die Denaturierung von Proteinen ist ein extremer und meist irreversibler Eingriff in die Probe. Dennoch belegen die gezeigten Temperatureinflüsse, dass die Änderungen der Probe im Ultraschallsignal nachvollziehbar zu erkennen sind. Ähnliche Versuche wurden zur Detektion der Fibrillenbildung von Insulin genutzt^{9, 11}.

4.2.5.3.3 pH-Einfluss

In Abbildung 57 ist beispielhaft eine Versuchsreihe gezeigt, bei der zwei Proteine unterschiedlicher molarer Masse bei verschiedenen pH-Werten vermessen wurden. Die Durchführung erfolgte nach der Vorschrift im Anhang 6.3.3. Das in hellem Rot gezeigte α -Chymotrypsin hat mit 25 kDa eine höhere Masse als das Lysozym. Beide Proteine wurden in 0,5 % (m/m) eingesetzt. Durch den Gewichtsunterschied zwischen den molaren Massen führt das zu einer niedrigeren molaren Konzentration an α -Chymotrypsin in den Lösungen als an Lysozym.

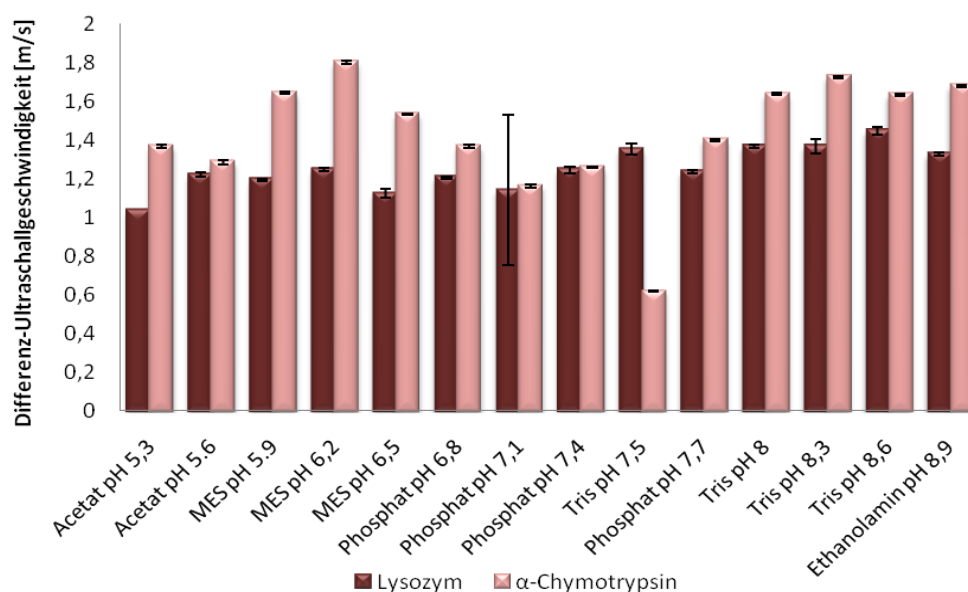


Abbildung 57: Vergleich des Einflusses verschiedener pH-Werte auf die Ultraschallgeschwindigkeit bei 0,5 % (m/m) Proteinlösungen.

Wie in der Abbildung 57 gezeigt, spiegelt sich dies allerdings nicht im Ultraschallsignal wider. Die Konzentration der Proben wurde über den im Anhang 6.8 beschriebenen Bratfordtest überprüft. Sie ist bei den Proteinproben pH-unabhängig nahezu konstant und erklärt nicht die Änderung der Werte. Erstaunlich ist, dass trotz geringerer Konzentration die gemessenen Ultraschallgeschwindigkeiten für die α -Chymotrypsin-Proben sogar über denen der Lysozym-Proben liegen. Damit bestätigt sich, dass bei Ultraschallmessungen, im Gegensatz zu optischen Messmethoden, nicht die Konzentration pauschal als Maß für die Nachweisgrenze verwandt werden kann. Der pH-Wert stellt für die Faltung eines Proteins einen entscheidenden Faktor dar.

Wie Abbildung 58 an einem Beispiel zeigt, ändert sich die Oberflächenladung eines Proteins je nach pH-Wert. Dadurch wird wiederum die Löslichkeit und Konformation beeinflusst. Die Messdaten in Abbildung 57 lassen keine eindeutige pH-abhängige Tendenz in ihrem Verhalten ablesen. Auffällig sind jedoch die schwankende Messwerte, die im Falle des α -Chymotrypsin um pH 6 und pH 8 die höchsten Werte für die Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit liefern. Es ist von Konformationsänderungen auszugehen, jedoch können diese nur durch weiterführende Untersuchungen quantifiziert werden.

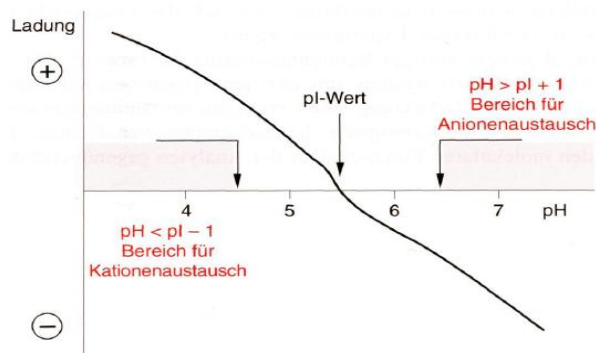


Abbildung 58: Einfluss des pH-Werts auf die Oberflächenladung eines Proteins. Der isoelektrische Punkt (pI) bezeichnet den pH-Wert für neutrales Verhalten ¹³².

Der Effekt der verschiedenen Faltungszustände eines Proteins auf die Ultraschallgeschwindigkeit ist Schwerpunkt der Untersuchungen. Die Größe und auch die Konformation haben Einfluss auf die Messung, wie das pH-abhängige Verhalten zeigt. Die NWG kann sich dadurch ebenfalls verändern. Damit muss die Anwendbarkeit des Ultraschall-Verfahrens für jedes Protein individuell auf sein Leistungsvermögen getestet werden. Durch die Modellprotein-Systeme soll eine Übertragung auf technische Anwendungen vorbereitet werden. Die Anpassung kann jedoch nur am realen System erfolgen.

4.2.5.4 Die Proteinbestimmung im Durchfluss

Zur Vorbereitung der Anwendung an realen Systemen gilt es auch die Einsatzfähigkeit des online-Systems zu gewährleisten. Die Bestimmung von Proteinen im Durchfluss wurde dazu als Test an den Modellproteinen (α -Chymotrypsin und Lysozym) wiederholt durchgeführt.

Abbildung 59 zeigt dazu einen Testzyklus mit α -Chymotrypsin. Die Messzellen wurden zunächst mit deionisiertem Wasser gespült. Die so erhaltene Grundlinie wurde am Ende des Versuchs wieder gefunden, was im Graph nicht gezeigt ist. Zu sehen ist der zeitliche Verlauf der Messung. Zu Beginn wurde in Messzelle 1 (Referenz) und Messzelle 2 (Probe) zunächst deionisiertes Wasser durch Puffer ersetzt. Der Anstieg im Messsignal beim Wechsel ist am Anfang des Graphen zu sehen. Anschließend wurde dem Probenstrom das α -Chymotrypsin zugefügt, was einen entsprechenden Anstieg des Messsignals zur Folge hatte.

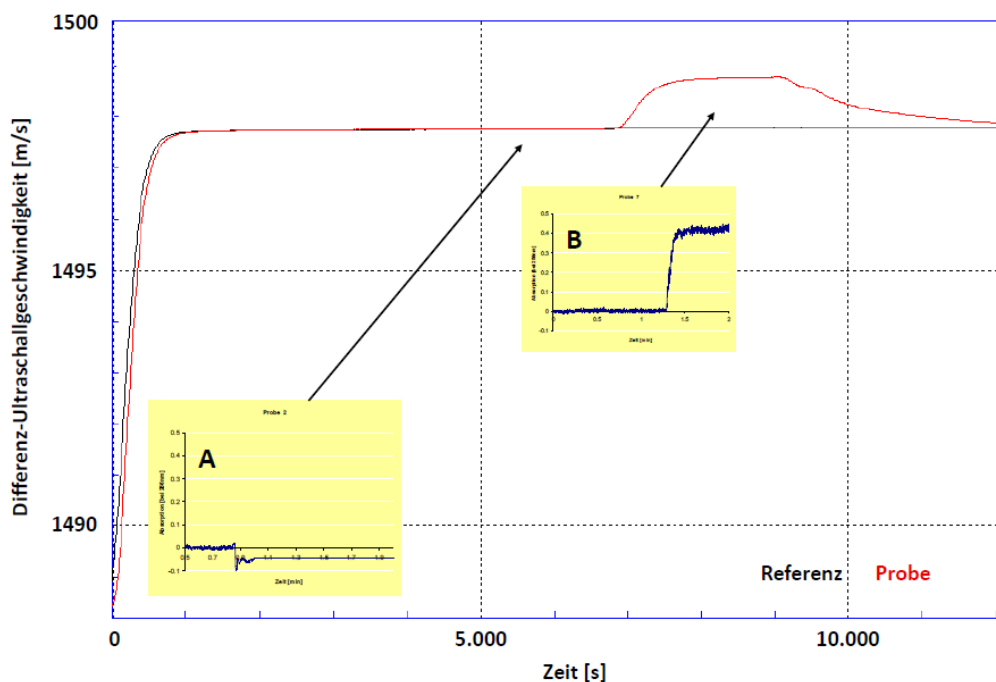


Abbildung 59: Graph der Messung einer 0,5 % (m/m) α -Chymotrypsin Probe in Puffer. Zu Beginn der Messung werden die mit deionisiertem Wasser gefüllten Messkammern mit Puffer gespült. Dies ist am steilen Anstieg bis 1000 s zu sehen. A zeigt einen negativ und B einen positiv verlaufenen BTEE-Aktivitätstest.

Um bestätigen zu können, dass das erhaltene Signal auf Protein zurückzuführen ist, wurde der im Anhang 6.7 beschriebene BTEE-Test durchgeführt. Proben die vor und nach Abklingen des Signals entnommen wurden, lieferten einen negativ Nachweis (A). Die Proben des Signals lieferten beim Test einen positiven Nachweis (B).

4.2.5.4.1 Überwachung der Denaturierung von Lysozym mit Harnstoff im Durchfluss

Harnstoff hat die beschriebene denaturierende Wirkung auf Proteine. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig. In diesem Abschnitt wird am Beispiel von Lysozym die Ultraschallanalyse dieses Verhaltens beschrieben. Es wurden Proben mit unterschiedlichem Harnstoffanteil mittels Ultraschall vermessen. Jeweils 30 ml Lösung mit einem Gehalt von 0-9 mol/L Harnstoff wurden in 50 mM Citratpuffer vorgelegt. Die Initialisierung erfolgte auf diesen Hintergrund. Anschließend wurde gegen eine entsprechende Probe als Referenz kontinuierlich bei 25 °C gemessen. Dem Probenstrom wurde das Lysozym zugefügt. Nach 2 h wurde die Messung beendet. Als Referenz wurden Fluoreszenzspektren aufgenommen. Dazu wurden der Probenvorlage in regelmäßigen Abständen 0,5 ml entnommen. Die Proben und Pufferpräparation sind im Anhang 6.4.2.3 beschrieben.

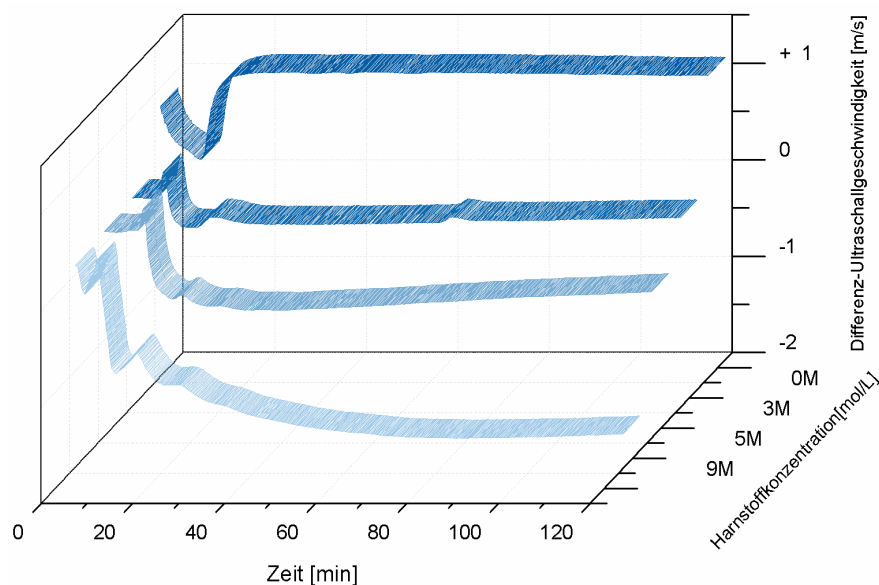


Abbildung 60: Denaturierung der Lysozymproben in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration und der Zeit. Durch die Messung im Kreislauf kommt es zur Rückvermischung in der Probe und damit zu Schwankungen während der Messung.

Die Messverläufe für harnstofffrei (0 M), 3 (3 M), 5 (5 M) und 9 mol/L Harnstoff (9 M) sind in Abbildung 60 gezeigt. Der Knick zu Beginn der Messung ist auf die Zugabe des Proteins zurückzuführen. Zu erkennen ist, dass sich die Proben je nach Harnstoffgehalt über die Zeit unterschiedlich verhalten. Das Signal der

Lysozymprobe ohne Harnstoff bleibt konstant auf einem Wert über 1 m/s, was dem nativen Signal früherer Messungen entspricht. Die Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit für die harnstoffversetzten Proben sinkt von 3 mol/L zu 9 mol/L immer weiter ab. Der Harnstoff bindet am denaturierten Protein und wird dadurch mit dem Protein der Lösung entzogen. Dadurch kommt es zu Messwerten im negativen Bereich. Durch den Einsatz der Dialyse würde der Gehalt an Harnstoff zwischen Probe und Referenz ausgeglichen. Um lediglich eine generelle Aussage über die Denaturierung treffen zu können, wurde der Versuchsaufbau vereinfacht ohne Dialyse gestaltet.

Proteine wie Lysozym sind durch ihre nachweisbaren Tryptophanreste für Fluoreszenzmessungen gut geeignet. Die Fluoreszenz wird von der Polarität der Umgebung beeinflusst, welche sich bei der Denaturierung ändert. Die Fluoreszenz gibt einen Gesamtwert für den denaturierten und nativen Anteil. Durch geeignete Kalibration ist es sogar möglich, daraus das Verhältnis von nativem zu denaturiertem Protein zu bestimmen. Für die Fluoreszenzmessungen wurde das LS50B der Firma Perkin Elmer (Deutschland) verwandt. Von der Probe ohne Harnstoff wurde ein Emissionsspektrum mit $\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$ und ein Anregungsspektrum mit $\lambda_{\text{Em}} = 340 \text{ nm}$ aufgenommen. Es wurden jeweils drei Messungen durchgeführt. Dies bestätigte die aus der Literatur bekannten Messparameter. Die Maxima der Fluoreszenz lagen bei $\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 340 \text{ nm}$. Daher wurden die übrigen Spektren bei diesen Einstellungen gemessen.

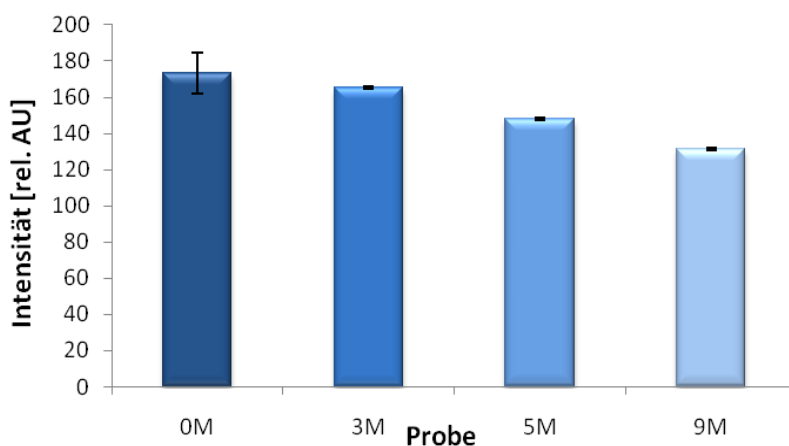


Abbildung 61: Fluoreszenzintensität von Lysozym in Gegenwart von Harnstoff. Die Proben wurden mit einer 1:50 Verdünnung vermessen.

Der Zusammenhang zwischen sinkender Intensität und steigender Harnstoffkonzentration ist in Abbildung 61 ebenfalls abzulesen. Dies zeigt eine Erhöhung des Anteils an denaturiertem Protein in der gemessenen Probe. Damit stützen die Fluoreszenzmessungen die Ergebnisse der Ultraschallmessung.

Durch die Analyse der Modellproteine RNase A, α -Chymotrypsin und Lysozym konnte bestätigt werden, dass der Proteinmonitor generell in der Lage ist Konformationszustände von Proteinen zu bewerten. Dies ermöglicht die Übertragung des Systems zur Messung an realen Proben. Im Folgenden wird an zwei Beispielen die Arbeit mit Realproben erörtert.

4.2.6 Kartoffelprotein-Aufreinigung mittels Membranadsorbertechnologie

Bei der Stärkegewinnung aus Kartoffeln fallen große Mengen an Kartoffelfruchtwasser als Nebenstromprodukt an. Dieses enthält bis zu 2 % Protein. Die Proteine können dem Kartoffelfruchtwasser durch Membranadsorber entzogen werden. Besonderes Interesse liegt dabei an der Gewinnung der in Abbildung 62 gezeigten Proteine Patatin und der Gruppe der Protease-Inhibitoren.

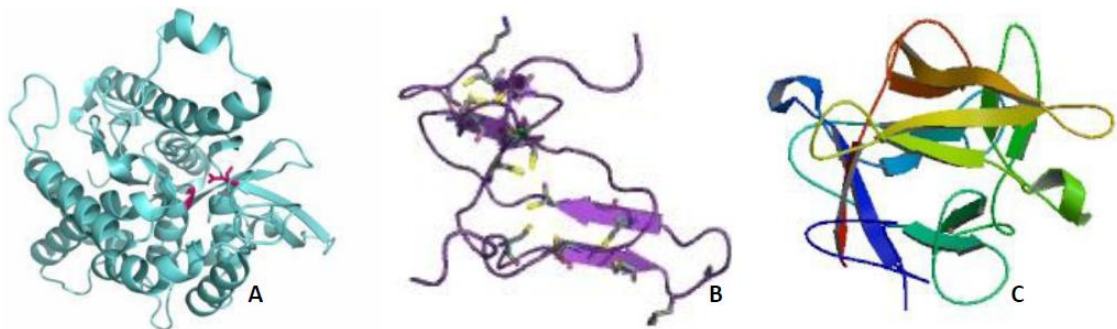


Abbildung 62: Links ist die Struktur des Patatins¹⁵⁹ (A) und rechts sind, als Vertreter der Protease-Inhibitoren, die Strukturen des Bowman Birk¹⁶⁰ (B) und des Kunitz¹⁶¹ (C) Inhibitors gezeigt.

Patatin ist ein Glykoprotein, das aus 362 Aminosäuren besteht und reich an Lysin und Tyrosin ist. Seine molare Masse beträgt 40-44 kDa. Es zeigt eine Lipid-Acylhydrolase/Transferase-Aktivität^{162, 163}. Bei den Protease-Inhibitoren handelt es sich um eine heterogene Klasse hitzestabiler, cysteinreicher Proteine mit einer molaren Masse von 4-23 kDa. Sie dienen den Pflanzen als Schädlingsabwehr¹⁶⁴. Die natürlichen Eigenschaften dieser Proteine machen sie interessant für Anwendungen in der Medizin oder der Nahrungsmittelbranche^{165, 166}.

Die spezifische Aufreinigung des Patatins und der Protease-Inhibitoren (PI) erfolgt über Membranadsorber. Dabei wird das Bindungsvermögen des Patatins (pI 5,1-9,0) an starke Anionen-Austauscher (Q-Membranadsorber) und der Protease-Inhibitoren (pI 4,5-5,2) an starke Kationen-Austauscher (S-Membran-adsorber) ausgenutzt. Das Kartoffelfruchtwasser wird in der Anlage direkt über die Adsorber geleitet. Das Waschen der Membranen wird mit 20 mmol/L Phosphat-Puffer durchgeführt, der damit ebenfalls keine hohe Salzfracht trägt. Die Rückgewinnung der Proteine von den Membranen wird mit 0,5 mol/L Natriumchlorid-Lösung erreicht. Im anschließenden Regenerations-schritt für die Membranen wird 1 mol/L Natriumchlorid-Lösung eingesetzt¹⁶⁷. Der hohe Einfluss dieser Cosolventien-Fracht auf die Ultraschallgeschwindigkeit muss daher in der Versuchsdurchführung mit dem Proteinmonitor berücksichtigt werden.

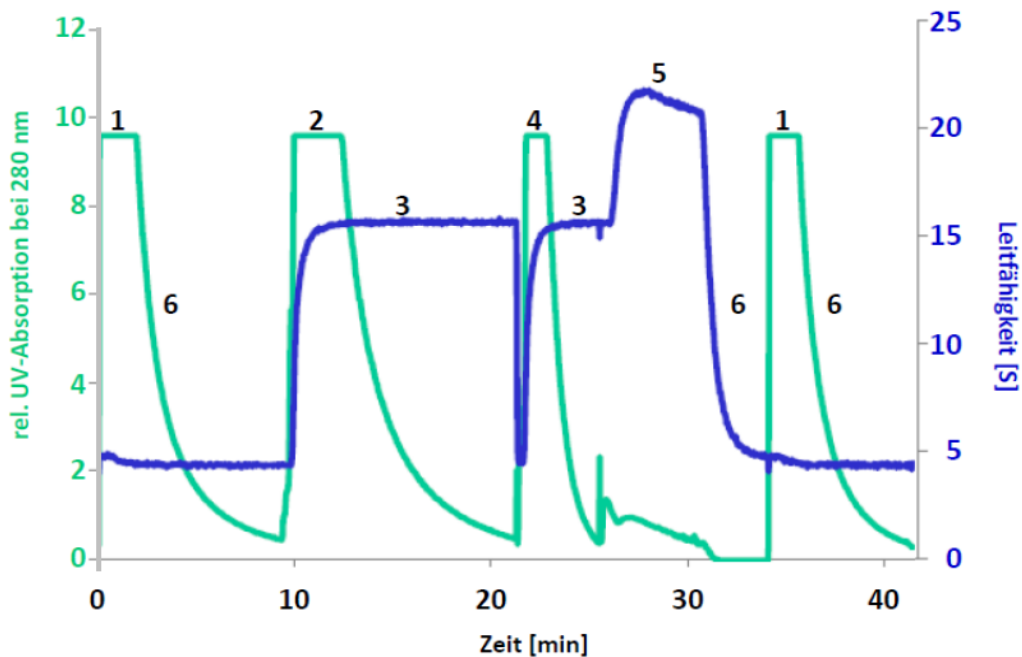


Abbildung 63: Verlauf der einzelnen Schritte während der Aufreinigung der Proteine durch Membranadsorber. Darstellung der gemessenen UV-Absorption in türkis und der Leitfähigkeit in blau. Die Detektoren sind direkt hinter der Membran angeschlossen, nach¹⁶⁸.

In Abbildung 63 ist dazu an einem Beispiellauf die Aufreinigung von Kartoffelprotein im Technikumsmaßstab genauer gezeigt. Die Anforderungen an unser Messsystem sind angelehnt an die einzelnen Prozessschritte. Während des Bela-

dens (1) der Membran mit Kartoffelfruchtwasser (KFW) ist die Leitfähigkeit in blau auf einem niedrigen Niveau und die UV-Absorption in türkis ist hoch. Beim anschließenden Waschen der Membran (6) sinkt die UV-Absorption ebenfalls auf ein Minimum und steigt beim Eluieren des Proteins (2 und 4) wieder an. Die Membranadsorber Q- und S-Module werden gleichzeitig beladen, aber nacheinander eluiert. Dabei steigt die Leitfähigkeit durch die hohe Salzkonzentration (3). Bei der Regeneration der Membran (5) sinkt der UV-Wert noch weiter ab und die Leitfähigkeit erreicht durch die 1 mol/L Natriumchlorid-Lösung ihr Maximum. Erst beim erneuten Waschen der Membran (6) mit Puffer sinkt diese wieder, so dass anschließend ein neuer Zyklus mit dem Beladen (1) der Membranen mit KFW begonnen werden kann.

Das aufgenommene UV-Signal zeigt mit seinen Maxima an, wann Protein den Prozess verlässt. Die Leitfähigkeit liefert dazu die Information über die Konzentration an Salz, die die Proben enthalten. Protein, das ohne Salzgradienten den Prozess verlässt, wurde nicht über die Membranadsorber gebunden und wird verworfen. Ebenso ergeht es Protein, welches sich erst im Regenerationsschritt von den Membranadsorbern löst. Dies sind die einzigen Ausschlusskriterien, die direkt während des Aufreinigungsprozesses vorgenommen werden.

Die bisher bei der Aufreinigung eingesetzte Analytik (Online-Bestimmung des Drucks, der UV-Absorption, der Leitfähigkeit und der Trübung)¹⁶⁷ gibt keine Auskunft über die Qualität der gewonnenen Proteinfractionen. Durch den Einsatz des Prozessmonitors könnte somit eine sinnvolle Ergänzung vorgenommen werden. Der Monitor kann dabei auch zum Optimieren der einzelnen Prozessschritte (Beladen, Waschen, Eluieren, Regenerieren) eingesetzt werden.

Aufgrund der Änderungen in der Salzkonzentration wurde zunächst getestet, ob die Online-Ultraschallgeschwindigkeitsbestimmung kompatibel zum Prozess ist und an welchen Stellen sie im Prozess die größte Informationsdichte liefert. Die durchgeführten Testläufe wurden an einer FPLC-Anlage (Fast Protein Liquid Chromatography-Anlage, Bio-Rad, München) vorgenommen. Bei diesem Versuchsaufbau konnte jedoch nur immer ein Membranadsorber genutzt werden. Die folgenden Messungen wurden daher alle mit einem S-Membranadsorber exemplarisch für die Aufreinigung mit Membranadsorbern gemacht. Abbildung 64 zeigt dazu den Verlauf der Aufreinigung.

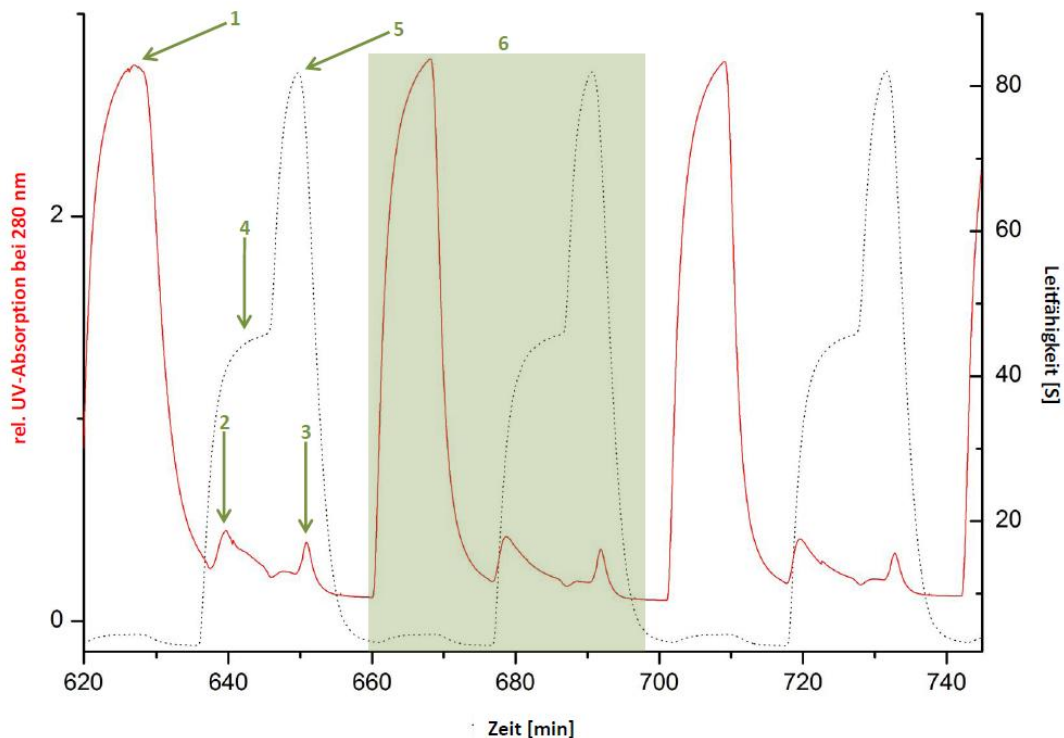


Abbildung 64: Vergrößerter Ausschnitt eines realen Messverlauf einer mehrere Prozessläufe umfassenden Messung an der FPLC. Die UV-Absorption (rot) und Leitfähigkeit (schwarz) sind gezeigt, nach ¹⁶⁸.

Es lassen sich die einzelnen Schritte, hier in grün markiert, wiederfinden. Unter (1) ist der UV-Absorptionsanstieg bei der Beladung der Membranen mit KFW zu sehen, (2) markiert den Elutionspeak und (3) den Regenerationspeak. Wie in der Vergrößerung in Abbildung 64 gut zu erkennen ist, verlaufen diese beiden Peaks parallel zu den Maxima in der Leitfähigkeit, (4) und (5). (4) gibt das Signal der Elutionslösung (0,5 mol/L Natriumchlorid-Lösung) und (5) das der Regenerationslösung (1 mol/L Natriumchlorid-Lösung) wieder. Die markierte Fläche unter (6) beinhaltet einen Prozesslauf mit Beladen, Waschen, Eluieren, Regenerieren und Waschen. Es wird nur einmal eluiert, da für die Probeläufe an der FPLC nur eine Membran angeschlossen war.

In Abbildung 65 sind die gesamten 27 Prozessläufe gezeigt. Die Signale sind der vorangegangenen Erklärung entsprechend beschriftet. Die (7) zeigt den 27.ten Prozesszyklus an. An dieser Stelle wurde, aufgrund der Verblockung des Membranmoduls die Messung beendet. Dieser Testlauf für die S-Membran wurde

ebenso zum Testlauf der Einsatzmöglichkeiten des Proteinmonitors an den Aufreinigungsprozess von Proteinen aus KFW mittels Membranadsorbern.

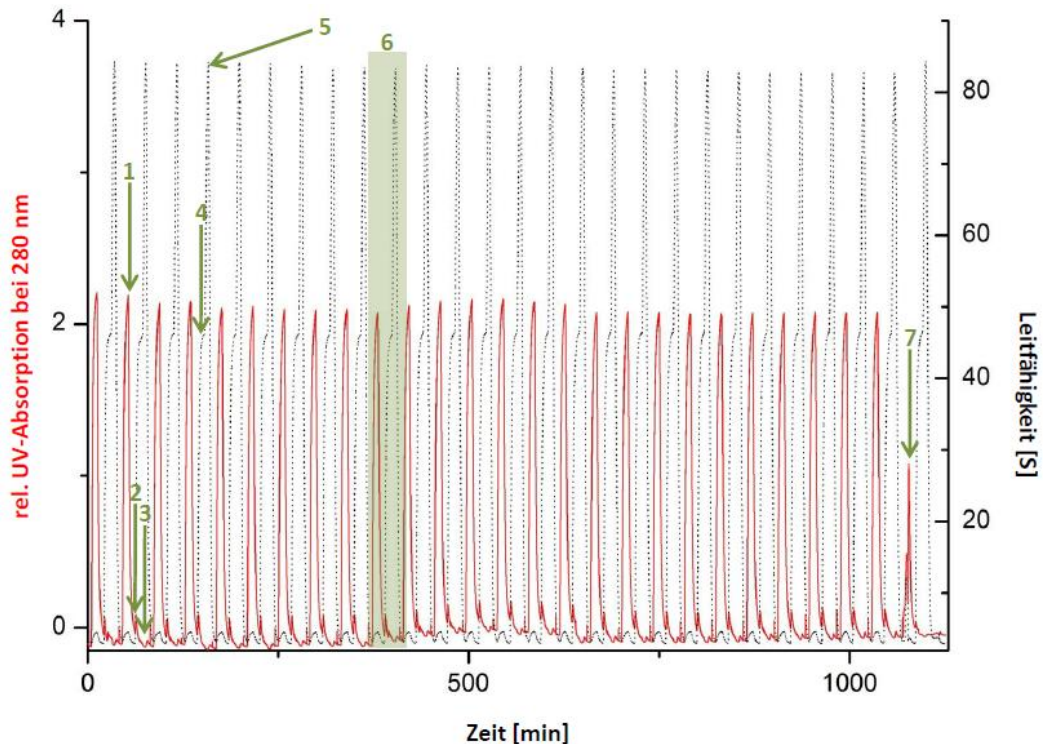


Abbildung 65: Gemessene UV-Absorption (rot) und Leitfähigkeit (schwarz) einer 27 Prozesszyklen umfassenden Messung der S-Membranadsorber im kleineren Maßstab an der FPLC, nach ¹⁶⁸.

Die in Abbildung 66 gezeigte Messung bildet die Summe der Werte aus Leitfähigkeit und UV-Absorption. Der Verlauf wurde den vorhergehenden Graphen entsprechend beschriftet. Die Doppelnummern sollen die Kombination der Information verdeutlichen. Das Signal des Beladens (1) und Waschens mit Puffer liefert die niedrigsten Werte, da die Lösung im Verhältnis gering konzentriert ist. Der Einfluss auf die Ultraschallgeschwindigkeit ist damit ebenfalls gering im Vergleich zum Elutionsschritt (2+4), mit seiner Salzfracht, oder dem Regenerationsschritt (3+5), mit der noch einmal doppelt so hohen Konzentration an Natriumchlorid.

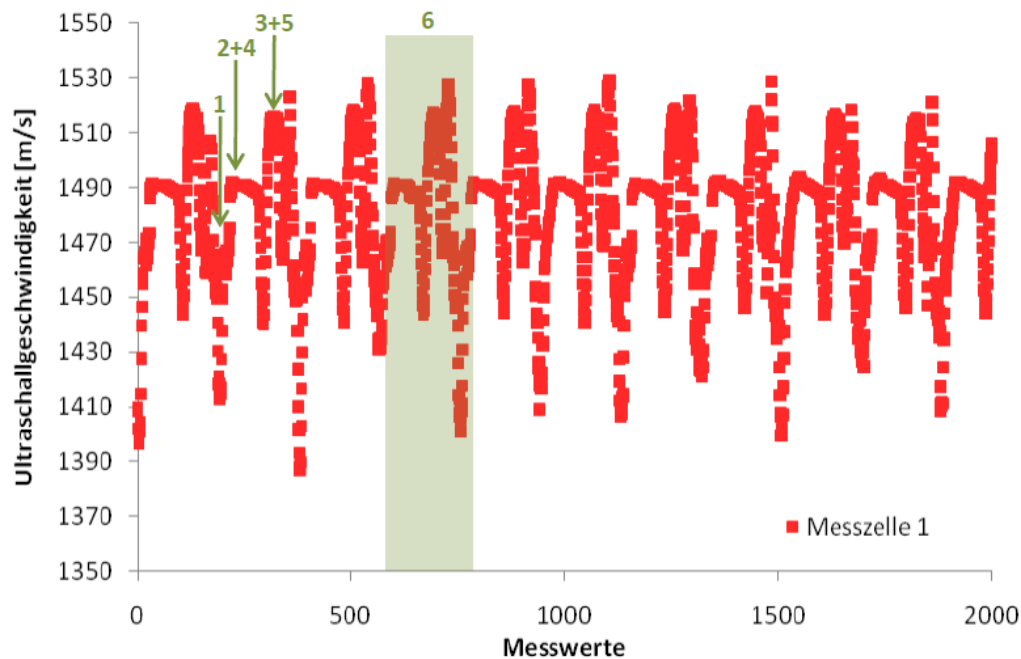


Abbildung 66: Verfolgung der Prozessläufe mittels Ultraschallmessung. In Rot sind die in der Messzelle 1 gemessenen Absolutwerte der Ultraschallgeschwindigkeit dargestellt.

Das gewünschte Einzelsignal des gewonnenen Proteins ist durch diesen Versuchsaufbau schwer zu realisieren, da das Signal von Schwankungen im Hintergrund der Probe, den Puffern und Lösungen, verdeckt wird, wenn die Referenz nicht optimiert eingestellt ist. Da das interessante Produkt, die Proteine, erst bei der Elution die Membran verlässt, konzentrierten sich die Bemühungen darauf die Ultraschallmessung an diesen Schritt anzupassen. Ein Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass die Referenz sich damit auf 0,5 mol/L Natriumchlorid-Lösung reduziert. Damit kann auch das Messsystem auf die Natriumchlorid-Lösung initialisiert werden, was die Genauigkeit der Messung erhöht (dazu 6.3.5).

Die in Abbildung 67 gezeigte Messung lässt die Proteinsignale in der Differenz schon erahnen. Allerdings sind die Ströme der beiden Messzellen nicht exakt parallel geführt, was zu dem ausreißenden Wert zu Beginn jedes Intervalls führt. Die Signalintensität liegt mit 1-2 m/s im Bereich dessen, was für Proteine erwartet wird.

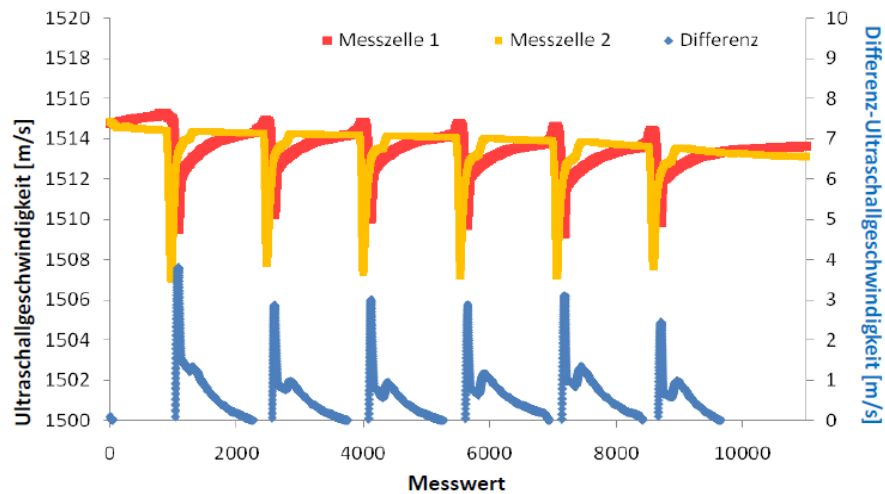


Abbildung 67: Einsatz des Proteinmonitors zur Verfolgung der Elution. In Rot sind die Messwerte der Messzelle 1 und in Gelb die der Messzelle 2 gezeigt. Die blauen Werte beziehen sich auf die rechte y-Achse und geben die Differenz der beiden Messzellen zueinander an.

Der Versuchsaufbau wurde weiter angepasst und eine Messung zur Bestimmung der Sensitivität der Ultraschallmessung durchgeführt. Der Versuchsaufbau dafür beruht auf der Rückführung der Elutionslösung in den Vorrat. Über mehrere Prozessläufe reichert sich das Protein in der Elutionslösung immer weiter an.

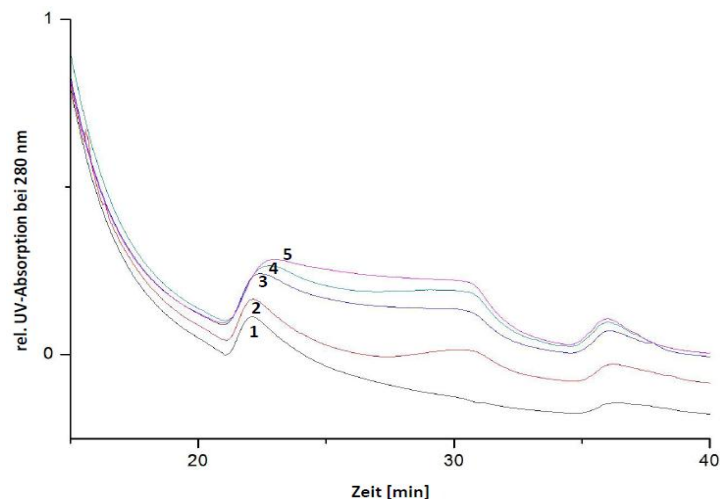


Abbildung 68: Gemessene Daten der UV-Absorption bei der Aufreinigung der Protease-Inhibitoren mittels S-Membranadsorber mit Rückführung des Eluenten, nach ¹⁶⁸.

Die Abbildung 68 zeigt die dazu aufgenommenen Daten mit dem UV-Detektor. Die Zahlen geben die Prozessläufe an. Die Konzentrationserhöhung von 1-5 kann mit dem steigenden UV-Signal, aber auch mit den steigenden Differenzwerten der Ultraschallgeschwindigkeit verfolgt werden.

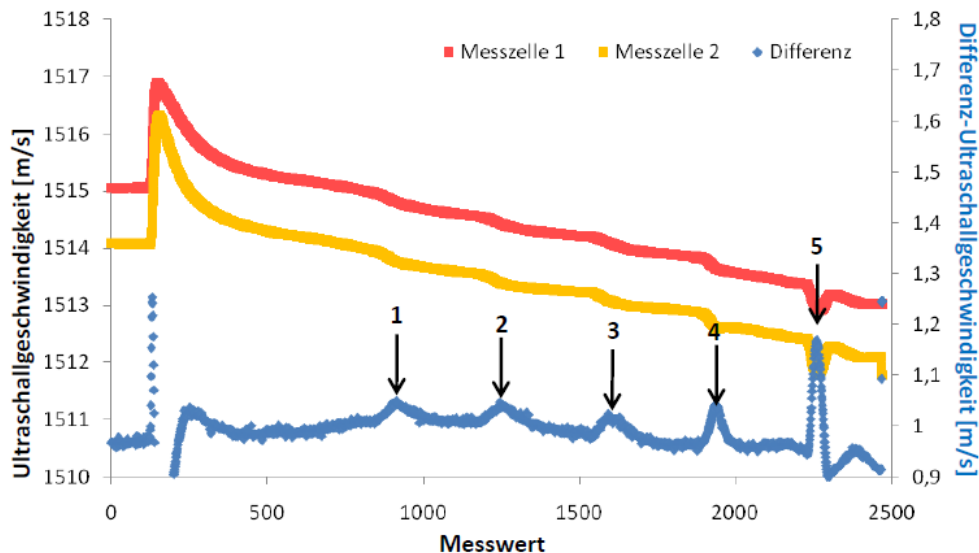


Abbildung 69: Verfolgung der Aufreinigung der PIs mit dem Proteinmonitor. Vergleichsdaten zum Lauf aus Abbildung 68.

Auffallend ist das abfallende Grundsignal über die Messung, das nicht in der Differenz wiedergegeben wird, aber beide Messzellen beeinflusst. Es lässt sich über die Verdünnung des Eluats bei jedem Lauf erklären. Vor dem Eluieren wird das System mit Puffer gespült. Reste dieses Puffers verbleiben in den Leitungen und vermischen sich beim Eluieren mit dem Eluatstrom. Diese Beobachtung konnte nicht mit der Leitfähigkeitssonde gemacht werden, da diese zu unempfindlich auf Schwankungen in der Salzkonzentration reagiert. Für die eigentliche Messung ergab sich durch diese Veränderung des Hintergrunds der Probe dank des Ausgleichs über die Dialyse keine Beeinträchtigung.

Die Erhöhung ist im Signal erkennbar, allerdings nicht im erwarteten Maße. Dies kann an der Wahl der Proteine, der Protease-Inhibitoren liegen. Die für den Ausgleich der Probe mit dem Hintergrund eingesetzte Dialyseeinheit ist für viele Proteine mit einem cut-off von 50 kDa als Barriere, Rückhalt im Probenstrom, ausreichend, da die Diffusion durch die Membran der Fasern bei dem gewählten Volumenstrom nicht schnell genug verläuft. Bei den Protease-Inhibitoren handelt es sich allerdings um ein Proteingemisch (Abbildung 70), das so kleine Proteine

enthalten kann, dass ihre Diffusion nicht ausreichend verzögert wird. Diese Proteine sind somit dialyse-gängig.

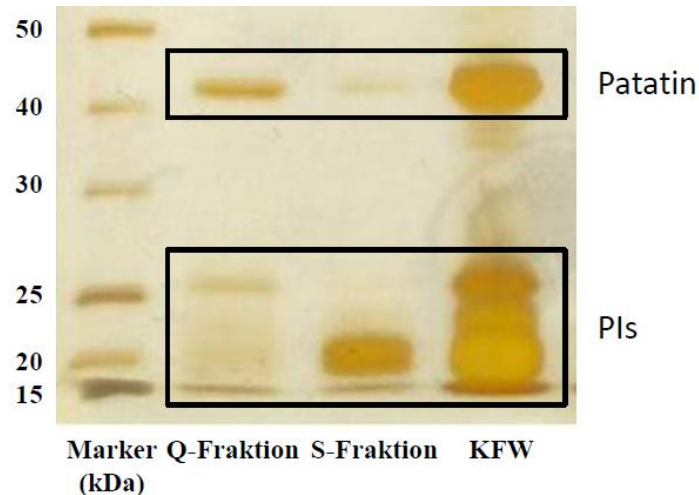


Abbildung 70: Die Bande des Patatin liegen wie erwartet bei 40 kDa die Banden der Protease-Inhibitoren konzentrieren sich bei 20 kDa. Auch weit unter 20 kDa sind noch Banden gut erkennbar (SDS-PAGE, Tris-HCl 18 % mit Silberfärbung) ¹⁶⁸.

Proteine die aus der Probe in die Referenz wechseln, werden erstens dem Eluat entzogen, was die Ausbeute verringert und zweitens verringern sie ihrerseits dazu noch das Differenzsignal in zweierlei Hinsicht. Das Probensignal nimmt aufgrund der erniedrigten Konzentration ab und das Referenzsignal nimmt aufgrund der erhöhten Konzentration zu. Der Differenzwert wird also verfälscht.

Dennoch zeigen bereits diese ersten Ansätze, dass die Ultraschallmessung zur Bestimmung von Konzentrationsänderungen in der Probe auch hier eingesetzt werden kann. Damit das Primärziel, die Bestimmung der Proteinfaltung, erreicht wird, bedarf es allerdings noch weiterer Anpassungen des Prozessmonitors an die Aufreinigung.

4.2.7 Platelet Derived Growth Factor (PDGF-BB)

PDGF-BB ist ein sogenannter Wachstumsfaktor. Er gehört, seiner Signalinduktion folgend, in die Gruppe der Platelet Derived Growth Factors. Allgemein sind Wachstumsfaktoren Polypeptide, die zur Signalvermittlung zwischen Zellen dienen. Die Möglichkeiten der Signalauslösung und -übermittlung sind

unterschiedlich. Die Wachstumsfaktoren binden jedoch meist an spezielle Rezeptoren der Zelle, ähnlich dem Prinzip von Enzymen^{169, 170}.

Das Protein PDGF-BB (Platelet-derived growth factor BB) ist ein disulfidverbrücktes Homodimer, dessen Monomere sich aus 110 Aminosäureresten zusammensetzen. Aus der Kristallstrukturanalyse der homodimeren BB-Isoform geht hervor, dass die Struktur der humanen Polypeptidkette B zwei lange, stark verdrehte, antiparallele β -Strangpaare aufweist, die insgesamt 59 der 110 Aminosäurereste umfassen¹⁷¹. Dies entspricht einem Gehalt an β -Faltblattstruktur des monomeren PDGF-B von 53,6% und ordnet es somit in die Klasse der β -Proteine ein (Abbildung 71).



Lys17–Ile25
Pro42–Ser50
Val58–Ile77
Lys81–Thr101

Abbildung 71: β -Faltblätter des monomeren PDGF-BB (Proteindatenbank: 1 PDGF)¹⁷¹.

Erste Analysen des Sekundärstrukturgehaltes des PDGF-BB mittels Zirkulardichroismusspektroskopie ermittelten einen β -Faltblattgehalt von 51% und einen vernachlässigbaren Anteil an α -helikaler Struktur (4%)¹⁷². Außerdem weist das Protein PDGF-BB sowohl drei intramolekulare (Cys16–Cys60, Cys49–Cys97 und Cys53–Cys99) als auch zwei intermolekulare (ausgehend von Cys43 und Cys52) Disulfidbrücken auf^{171, 173}.

Die Firma Cellgenix, Freiburg, hatte Proben ihres PDGF-BB untersucht und dabei einen konzentrationsabhängigen Wechsel im Verhalten der Proben beobachtet. Die zur Verfügung gestellten Protokolle zweier Kurzexperimente dokumentieren diese Beobachtungen. Der in Abbildung 72 gezeigte HPLC-Lauf steht exemplarisch für die dem Protokoll zu entnehmenden Versuche, bei denen verschiedene Konzentrationen an Protein für die Untersuchung vorgelegt wurden.

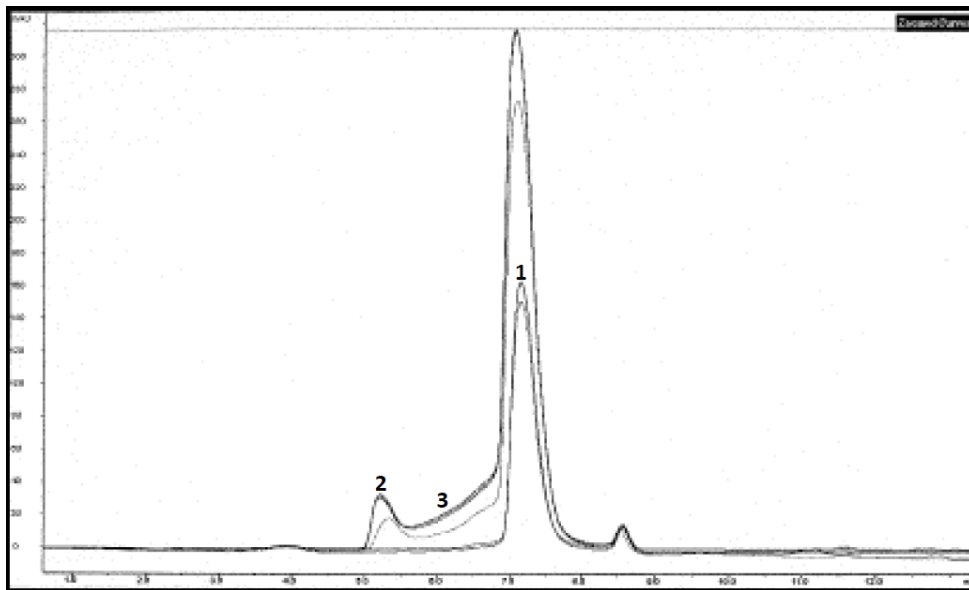


Abbildung 72: HPLC-Lauf verschieden konzentrierter Proben aus einem Protokoll von Cellgenix, Freiburg ¹⁷⁴. Die Nummerierung ist nachträglich eingefügt worden.

Die höher liegenden Kurven entsprechen höher konzentrierten Proben. Bei niedrigen Konzentrationen tritt nur der Dimerpeak des PDGF-BB (1) auf. Mit steigender Konzentration ist die Ausbildung eines vorgelagerten Peaks (2), Oligomerpeak, und einer verbindenden Schulter (3) zu beobachten.

Die Fläche der HPLC-Peaks wurde bei einem weiteren Lauf analysiert, was zu den Ergebnissen aus Abbildung 73 führte. Die Werte der aufgetragenen Proben liegen bis zu einer Konzentration von $\sim 0,25$ mg/ml auf der gezeigten Regressionsgeraden. Die Werte höher konzentrierter Proben weichen nach unten von dieser ab. Diese Abweichung beruht nach dem Protokoll auf der Dimer- bzw. Oligomerbildung. Die im Graphen gezeigten hellen Punkte bei höherer Konzentration berücksichtigen das Probenmaterial, das dem Dimer- bzw. Oligomer-Peaks zugeordnet werden konnte. Das Probenmaterial konnte also vollständig, allerdings in anderer Aggregatform, wieder gefunden werden ¹⁷⁴.

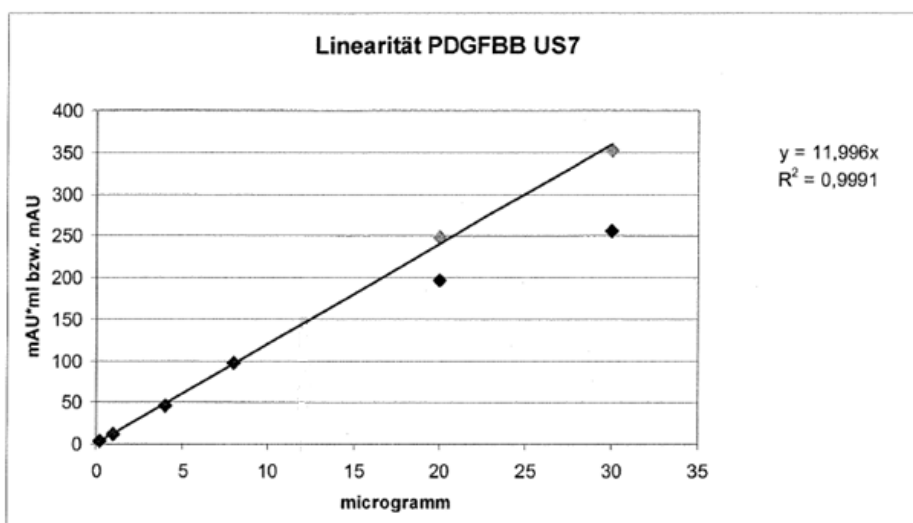


Abbildung 73: Auswertung des HPLC-Laufs von PDGF-BB ¹⁷⁴.

Ein späteres Protokoll ¹⁷⁵ bestätigt die Vermutung des vorherigen Protokolls, dass es sich um eine konzentrationsabhängige Oligomerisierung handelt. Es wurden auch verschiedene Proben mit SDS-Page analysiert, allerdings lag dafür kein vollständiges Protokoll vor.

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist die Klärung einer möglichen Oligomerbildung des PDGF-BB durch Alterung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Für alle nachfolgenden Analysen wurden an der Leibniz Universität Hannover (LUH) und der Technischen Universität Dortmund (TU Dortmund) die gleichen Proteinproben verwendet. Die Proben wurden wie in Kapitel 6.5.3 beschrieben, vorbehandelt. Die Probenvorbereitung erfolgte an der LUH aus jeweils 50 µg enthaltenden Vials, die von der Firma Cellgenix zur Verfügung gestellt wurden. Das Protein wurde auf die gewünschte Konzentration mit PBS-Puffer verdünnt und 100 µl SDS 10 % wurden hinzugefügt. Die vorbereitete Probenmenge für jede Konzentration betrug 1 ml. Es wurden drei verschiedene Probenvarianten aus diesen 1 ml-Ansätzen generiert.

In Tabelle 14 sind die Unterschiede der mit I bis III bezeichneten Proben aufgeführt.

Tabelle 14: Definition der Probenvarianten.

I	180 µl der Probe schockgefroren
II	180 µl der Probe nach der Messung im Ultraschallmessgerät
III	180 µl der Probe erhitzt auf 60°C für 30 Min, dann schockgefroren

Das Schockgefrieren erfolgte in flüssigem Stickstoff. Aufgrund der Vergleichbarkeit wurde die Probenvorbereitung auch für die TU Dortmund vorgenommen. Dazu wurden die Proben I und III an die TU für weitere strukturaufklärende Messungen (Zirkulardichroismusspektroskopie, Rasterkraftmikroskopie) versandt. Die Ergebnisse zu diesen Messungen sind im Anhang unter 6.5 gezeigt.

4.2.7.1 Ultraschallanalyse der PDGF-BB-Proben

Für die erste Versuchsreihe wurden Proben mit 200 µg/ml, 225 µg/ml, 250 µg/ml, 275 µg/ml und 300 µg/ml angesetzt. Für die Ultraschallmessung kamen wie beschrieben die mit II gekennzeichneten Proben zum Einsatz. Das verwendete Messgerät ist eine statische Variante des Ultraschall-Resonator-Technologie-Systems (URT-System) der Firma TF-Instruments, Heidelberg. Das Gerät arbeitet mit der neu entwickelten Software. Dieser Versuchsteil zielte auf die vermutete Oligomerbildung durch Alterung ab. Dazu wurden die Proben im Ultraschall-Messgerät stufenweise von 20°C über 40°C auf 60°C erhitzt. Diese Temperatur wurde gehalten, um eine Alterung zu begünstigen. Anschließend wurden die so behandelten Proben erneut dieser Temperierung ausgesetzt, um die Messdaten der Ursprungsprobe mit diesen vergleichen zu können.

Die Ultraschalltechnologie ist in der Lage, Proteinzustände, durch ihren signifikanten Einfluss auf die Ultraschallgeschwindigkeit der Probe, unterscheiden zu können¹². Je größeren strukturellen Veränderungen die Proteine in der Probe unterliegen, umso höher ist die Änderung der Ultraschallgeschwindigkeit der Probe. Zustandsänderung wie die vermutete konzentrationsbedingte Oligomerbildung sollten daher einen nachweisbaren Unterschied in der Ultraschallgeschwindigkeit verursachen. Die Oligomerisierung ist bei den gewählten Versuchsbedingungen, mit gleichbleibender Konzentration, irreversibel. Die Änderung in der Ultraschallgeschwindigkeit sollte daher, nachdem sie eingetreten ist, auch bei den anderen Temperaturstufen zu beobachten sein.

In Abbildung 74 ist exemplarisch die Messung der Probe 225 (225 µg/ml) gezeigt. Die blaue Kurve zeigt den Temperaturverlauf der Messung. Wie beschrieben startet die Messung bei 20 °C. Eine längere Messung erfolgt nach dem Aufheizen bei 40 °C und schließlich bei 60 °C. Die der Temperatur folgenden Änderungen im Verhalten der Ultraschallgeschwindigkeit sind hier als Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit in dunkelgrün gezeigt. Die Messwerte der als Referenz gewählten Probe aus Puffer mit SDS 10 % wurden von denen der

PDGF-BB-Probe subtrahiert. Durch dieses Verfahren ist es möglich selektiv den Einfluss der Proteine auf die Ultraschallgeschwindigkeit der Probe zu betrachten. Veränderungen des Proteins durch die Temperatur werden so direkt im Messwert ablesbar. Dass es einen Einfluss der Temperatur auf die Proteine gibt, lässt sich sehr schön an der Differenz der Werte für 20 °C und 60° C von ~2 m/s sehen. Für die Auswertung dieser Graphen wurde die Veränderung der Ultraschallgeschwindigkeit der Proben beim ersten Aufheizen (vorher = v), mit dem des zweiten Aufheizens (nachher = n) verglichen.

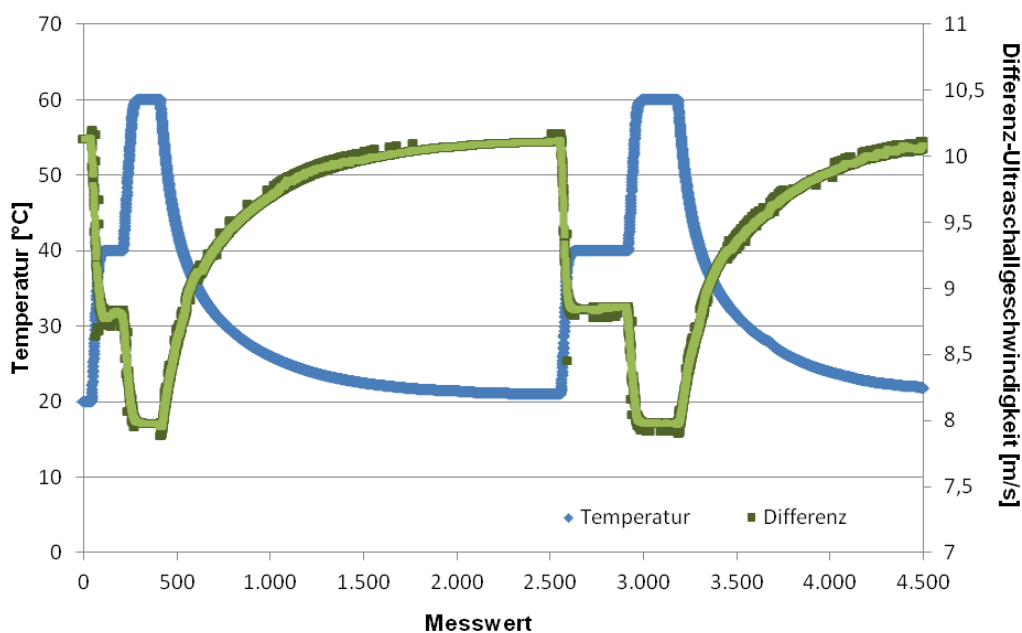


Abbildung 74: Ultraschallmessung während der stufenweisen Aufheizung der Probe 225. In Dunkelgrün sind die Differenzwerte in der Ultraschallgeschwindigkeit gezeigt. In Hellgrün, darüber liegend, sind die Differenzwerte geglättet über 21 Messwerte abgebildet.

In Abbildung 75 ist dazu zunächst die graphische Auswertung gezeigt. Die Kurven der Messungen für die Referenz sind in Dunkelgrün dargestellt. Die Daten der Probe sind in Hellgrün gezeigt. Durch das Betrachten dieser Kurven ist zu erkennen, wie ähnlich sich das Verhalten der Proben v und n ist. Diese Beobachtung wird noch einmal durch die in orange gezeigten Differenzdaten bestätigt. Die Messdaten sind nahezu deckungsgleich. Bei den gezeigten Beispielgraphen handelt es sich um Messungen der 225 µg/ml PDGF-BB-Probe. Da die postulierte Oligomerisierung erst ab einer Konzentration von ~250 µg/ml auftreten soll, ist

das beobachtete gleiche Verhalten der Proben v und n nicht verwunderlich. Es belegt die These, dass es in diesem Konzentrationsbereich nicht zu einer dauerhaften Veränderung der Proteinaggregation, auch nicht durch Temperatureinfluss, kommt.

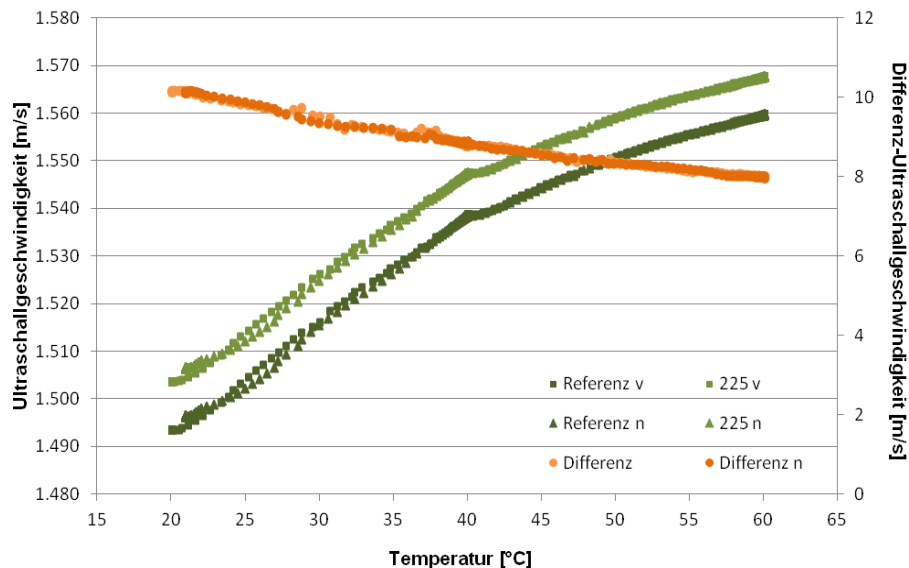


Abbildung 75: Vergleich der Ultraschallmessungen der Probe 225 (225 µ/ml). Die Differenzwerte wurden über 5 Werte geglättet um geräthedingte Temperaturschwankungen ausschließen zu können und die Übereinstimmung der Messläufe zu unterstreichen.

Die Messwerte der anderen Datenreihen wurden auf gleiches bzw. abweichendes Verhalten hin untersucht. In Abbildung 76 sind die Differenz-Ultraschallgeschwindigkeiten für 20 °C, 40 °C und 60 °C graphisch dargestellt. Die grünen Balken geben dabei die Werte für die v Proben an. Im Vergleich dazu sind die Werte der n Proben, durch orange Rauten gezeigt. Als Validierung der Referenz-Messungs-Methode für die Auswertung mittels Differenzbildung sind die Werte eines Versuchslaufs ohne Protein, also Referenzprobe gegen Referenzprobe (PBS-PBS), gezeigt. Die 300 Proben sind nicht mit aufgeführt, da die Konzentration aufgrund der komplexen Probenvorbereitung für diese Proben nicht genau bestimmt war. Die Messwerte lassen ein ähnliches Verhalten aller Proben vermuten. Es ist ein Gefälle der Daten von 20 °C zu 60 °C zu erkennen. Ob es allerdings signifikante Unterschiede zwischen den Proben 200 und 275 gibt, die auf eine Oligomerbildung hindeuten, kann hieran nicht gezeigt werden.

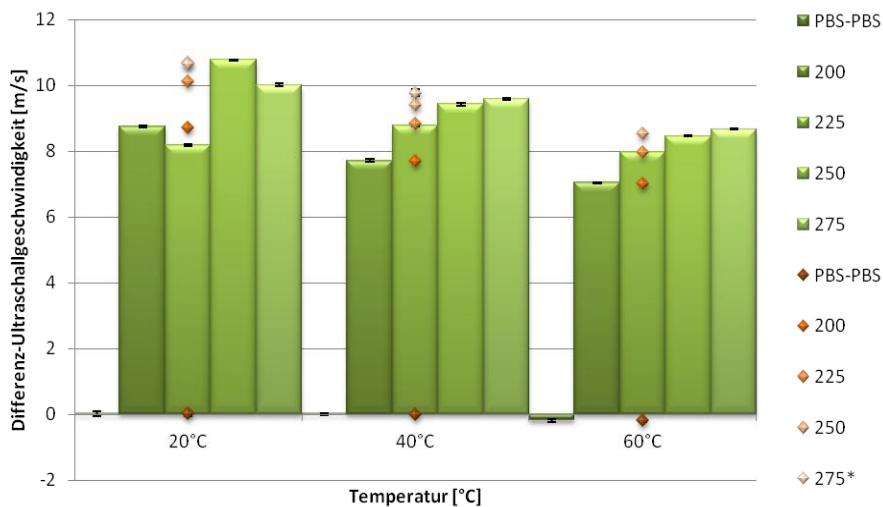


Abbildung 76: Vergleich der Differenz-Ultraschallgeschwindigkeiten der v (grün dargestellt) und n Proben (Orange dargestellt) 200 – 275. (*Die Messung wurde bei 25 °C durchgeführt.)

In Abbildung 77 ist daher eine vergrößerte Darstellung abgebildet.

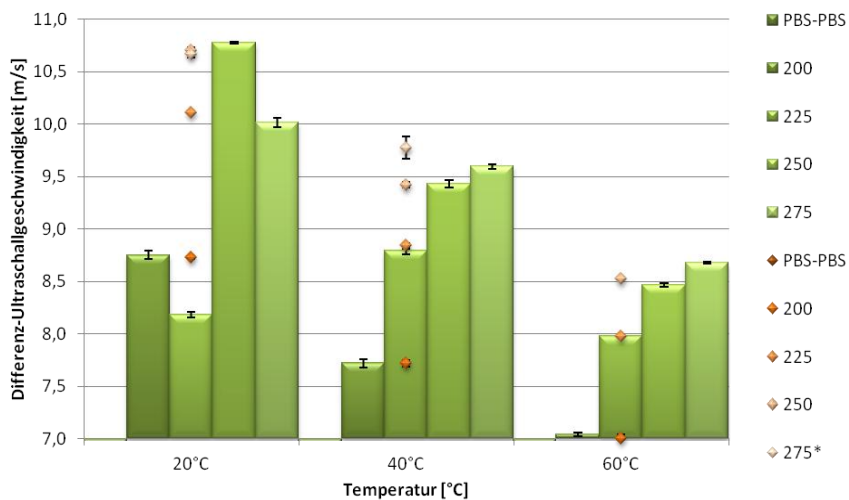


Abbildung 77: Vergrößerte Darstellung der Abbildung 76.

Es lässt sich wieder der Abstand von ~2 m/s zwischen den Werten von 20 °C und 60 °C erkennen. Auffällig ist jedoch, dass dieses Verhalten alle Messreihen gemein haben. Die höher konzentrierten Protein-Proben zeigen kein abweichendes Verhalten. Einzig der 250 n und 275 n weichen ab, da sie nahezu gleich sind. Der

Wert der Probe 275 n wurde jedoch bei 25°C gemessen, was diese Abweichung erklären kann. Durch das luftgekühlte statische System, war bei den gegebenen Bedingungen ein Erreichen von einem stabilen Temperaturwert bei 20 °C für das System nicht möglich. Es lassen sich ab einer Konzentration von 250 µg/ml Steigerungen der Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit im Dezimeterbereich erkennen. Bei einer die ganze Probe umfassenden Oligomerbildung wären allerdings signifikantere Unterschiede zu erwarten gewesen. Eine konzentrationsabhängige Oligomerisierung kann aufgrund der Daten an dieser Stelle weder bestätigt noch widerlegt werden. Für die genaue Aufklärung der strukturellen Verhältnisse reicht die Ultraschallanalyse nicht aus.

Der Ansatz der zweiten Versuchsreihe war die Untersuchung des Verhaltens der Proben während des Temperierens auf 60 °C. In Abbildung 78 sind dazu zunächst die Maximalwerte der gemessenen Ultraschallgeschwindigkeit während der Messung in Abhängigkeit von der Konzentration gezeigt.

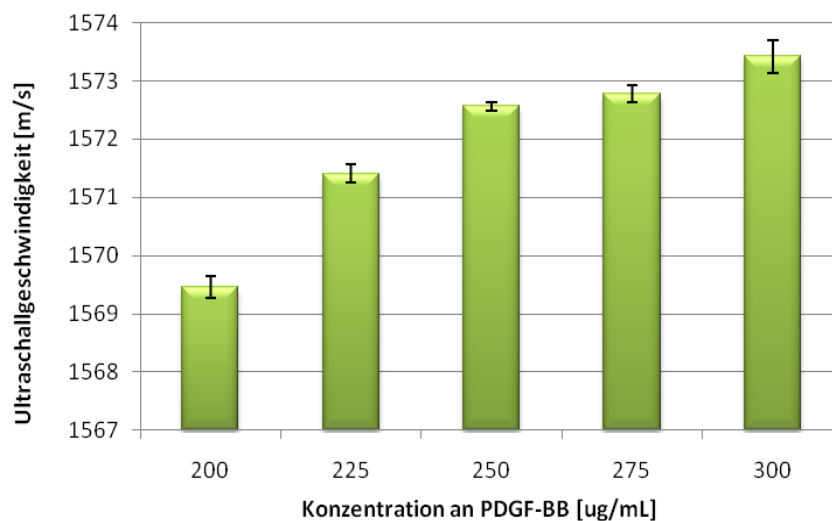


Abbildung 78: Maximalwerte der Ultraschallgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Konzentration der vorgelegten Protein-Probe.

Die Konzentration hat meist einen geschwindigkeitserhöhenden Einfluss auf die Ultraschallgeschwindigkeit. Dies lässt sich auch hier im Anstieg in der Ultraschallgeschwindigkeit von der niedriger konzentrierten zur höher konzentrierten Probe sehen. Auffällig ist, dass die Sprünge der Ultraschallgeschwindigkeit zwischen den Konzentrationen über 250 µg/ml kleiner sind. Dies könnte auf

eine veränderte Aggregation hindeuten. Die Messdaten der gesamten Messung sind in Abbildung 79 gezeigt.

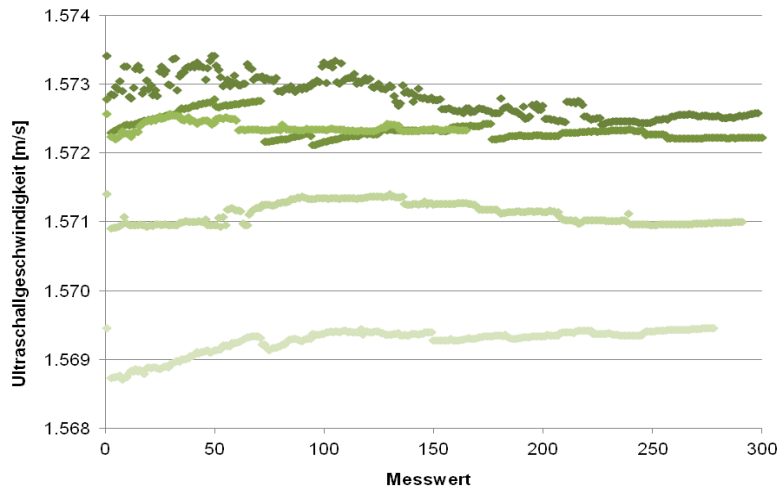


Abbildung 79: Messwerte der Ultraschallgeschwindigkeit der Proben 200 bis 300 bei der Temperierung auf 60 °C für 30 min.

Die Änderungen in der Ultraschallgeschwindigkeit bewegen sich wiederum im Dezimeterbereich. Es lässt sich kein Zusammenhang einer systematischen Ab- oder Zunahme der Messwerte über oder unter der Konzentrationsgrenze von 250 µg/ml nachweisen.

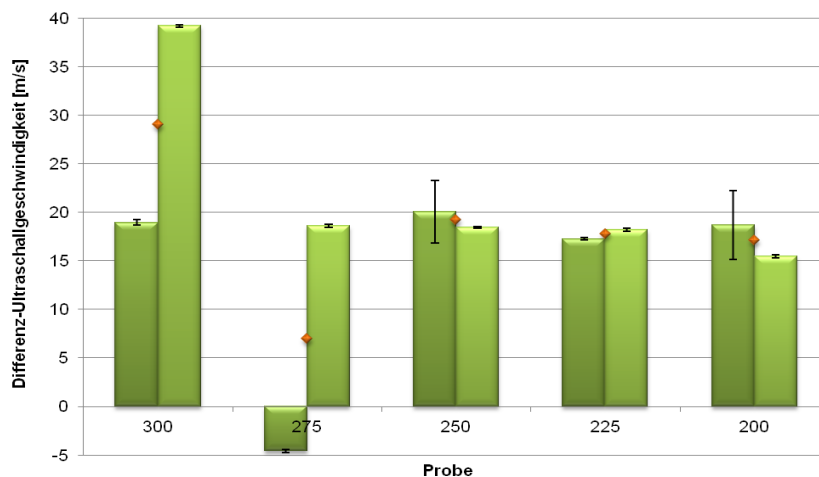


Abbildung 80: Ergebnisse der Messung der Proben auf 60 °C für 30 min.

In Abbildung 80 sind zu diesen Daten die Differenz-Ultraschallgeschwindigkeiten aufgeführt. Die Differenzbildung wurde in diesem Fall gegen deionisiertes Wasser aufgenommen, da lediglich die Temperaturschwankungen bei 60 °C ausgeglichen werden mussten. Daraus ergeben sich für die Absolutwerte höhere Werte.

Aufgrund der geringen Probenmenge konnten bei den Versuchsteilen leider keine aussagekräftigen Mehrfachbestimmungen gemacht werden. Die Identifizierung stark abweichender Werte ist daher erschwert und stark spekulativ. Auffallend bei den untersuchten Proben ist jedoch die stärkere Abweichung vom Mittelwert bei Konzentrationen über 250 µg/ml. In Tabelle 15 sind dazu noch einmal die genauen Messdaten und deren Präzision gezeigt.

Tabelle 15: Messdaten der Proben.

Probe	Differenz (Z2-Z1) [m/s]		Durchschnitt	Präzision der Differenz [m/s]	
DI	-0,0686	-	-0,0686	0,0089	-
300	18,9519	39,2074	29,0796	0,2891	0,1111
275	-4,5976	18,5894	6,9959	0,1508	0,1594
250	20,0425	18,4641	19,2533	3,2383	0,0915
225	17,2785	18,2306	17,7546	0,1399	0,1504
200	18,7034	15,4914	17,0974	3,5683	0,1529

Die Daten dieser erneuten Messreihe konnten die These der konzentrationsabhängigen Oligomerisierung ebenfalls weder belegen noch widerlegen. Die Daten sind nicht aussagekräftig genug, um eindeutige Schlüsse zu ziehen. Es ist möglich, dass die Oligomerbildung nur schwach ausgeprägt ist und daher der Effekt auf die Ultraschallgeschwindigkeit ebenfalls nur gering ist. Diese These stützen die zu Beginn besprochenen HPLC-Graphen. Diese zeigten nur eine anteilige Oligomerbildung. Die Auswirkungen auf die Ultraschallgeschwindigkeit im Dezimeterbereich können darauf zurückgeführt werden. Für eine eindeutige Aussage wären allerdings noch weitere Messreihen notwendig. Dafür würde eine größere Menge Probenmaterial benötigt werden. Die unter Punkt 2 und 3 folgenden Referenzdaten sollten daher beim endgültigen Fazit der durchgeführten Analysen ausschlaggebend sein. Die Ergebnisse der strukturellen Untersuchungen an der TU (siehe Kapitel 6.5) waren ebenfalls nicht stichhaltig genug, um die aufgestellte These einer konzentrationsabhängigen Oligomerisierung zu stützen. Dennoch konnten die temperaturbedingten strukturellen Veränderungen der Proteine beim Aufheizen verfolgt werden. Erste Anzeichen für ein verändertes Verhalten

konnten beobachtet werden. Somit hat sich die Ultraschallanalyse als Nachweisinstrument für Proteinkonformationsänderungen bestätigt.

4.3 Weiterführende Einsatzgebiete: „nicht wässrige Systeme“

Das Messsystem und die Software wurden bevorzugt darauf ausgelegt wässrige Proben zu vermessen. Nichtsdestotrotz ist die mit dem Proteinmonitor erreichbare hochauflösende Ultraschallgeschwindigkeitsmessung auch in anderen Bereichen von Interesse. Zwei weitere getestete Anwendungsgebiete werden daher im Folgenden vorgestellt.

4.3.1 Ionische Flüssigkeiten (IL)

Mitte des 19. Jahrhunderts wurden Ionische Flüssigkeiten (**I**onic **L**iquids, **ILs**) erstmals als eigene Substanzklasse wahrgenommen. Es sind Salze, deren Schmelzpunkt unterhalb des Siedepunkts von Wasser liegt. Die reine Flüssigkeit besteht nur aus Anionen und Kationen¹⁷⁶. Sie stellen eine Möglichkeit dar, sogenannte VOCs (volatile organic compounds) in chemischen Synthesen zu ersetzen und diese somit ökologischer zu gestalten. Ihre Popularität haben sie aber ihren vielseitigen Einsatzmöglichkeiten zu verdanken. Durch ihre geringe Flüchtigkeit können sie in Hochvakuum-Systemen, und da sie nicht brennbar sind, auch für exotherme Reaktionen ohne Gefahr eingesetzt werden. ILs sind üblicherweise in einem weiten Temperaturbereich, bis zu 300 °C, flüssig. Dies ermöglicht eine ganz neue Art der Reaktionsführung, die andere Lösemittel nicht bieten¹⁷⁷. Die Reaktion kann im flüssigen Lösemittel bei hohen Temperaturen durchgeführt werden. Anschließend wird das Produkt im immer noch flüssigen Lösemittel bei aber bei z. B. 150 °C tieferer Temperatur auskristallisiert. Bei passender Wahl der IL erhöht sie die Lebenszeit von eingesetzten Enzymen, beeinflusst die chemische Selektivität¹⁷⁸ von Reaktionen und erleichtert die Rückgewinnung von Katalysatoren¹⁷⁹. Doch ihr Einsatz als Flüssigkeit mit besonderen physikalischen Eigenschaften ist auch in technischen Bereichen abseits der reinen Chemie von Interesse^{176, 180}. Die Entwicklung neuer ILs und die Erforschung ihrer Eigenschaften bilden noch einen großen Bereich der IL-Forschung. Dieser schließt auch ihre toxikologischen Eigenschaften mit ein^{176, 181}.

Ein Projekt der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, das von Frau Ramunno bearbeitet wird, beschäftigt sich mit den Eigenschaften von Ionischen

Flüssigkeiten¹⁸². Die Reinheit der ILs muss dabei für technische Anwendungen gewährleistet sein. Als eine Hauptverunreinigung der ILs zählt Wasser. Durch Ultraschallgeschwindigkeitsmessungen mit dem DSA 5000 (siehe Anhang 6.10) wurde in Erlangen u.a. versucht den Verunreinigungsgrad von definierten IL-Proben zu bestimmen. Anhand der Daten soll ein Kontrollsystem entwickelt werden. Die Proben für die im Folgenden gezeigten Messungen wurden, mit bereits festgelegtem Wassergehalt, bereitgestellt. Zu jeder IL wurden sieben Verdünnungsstufen untersucht. Zu den drei Beispiel-ILs wurden ebenfalls die Daten der Messungen mit dem DSA 5000 zum Vergleich zur Verfügung gestellt. Die Vergleichsdaten wurden jedoch mit lediglich ähnlich konzentrierten Proben erstellt. Die genauen Wasseranteile der Proben sind den Tabellen der einzelnen Abschnitte zu entnehmen. Die Messungen wurden mit der statischen Messzelle durchgeführt, um Probenmaterial zu sparen. In die Messzelle 1 wurde die reine IL (wie geliefert) als Referenz vorgelegt. In die Messzelle 2 wurden die Proben mit aufsteigendem Wassergehalt nacheinander eingefüllt und, wie im Anhang 6.3 beschrieben, vermessen.

Das Messsystem bietet die Möglichkeit, den Schalldruck in 3 Stufen zu steigern. Bei wässrigen Proben ist dies üblicherweise nicht nötig. Der systembedingte Standardschalldruck ist auf wässrige Lösungen ausgelegt. Hiermit ist die Schallabsorption des Signals dementsprechend klein, so dass die Messung nicht beeinträchtigt wird. Bei den ILs kam es jedoch zu erheblichen Schallabsorptionen, so dass nur durch Erhöhung des Schalldrucks überhaupt eine Messung möglich war. Die Steigerung ist in Dezibel (db) von db+6, db+12 und db+18 Schritten möglich. Im Kapitel 4.3.1.1.1 bis 4.3.1.1.3 sind die Ergebnisse der Messungen für die drei IL 1-Ethyl-3-methylimidazolium Ethylsulfat [EMIM] [EtSO₄], 1-Ethyl-3-methylimidazolium Methylphosphonat [EMIM] [MeOHPO₂] und 1-Ethyl-3-methylimidazolium trifluoromethansulfonat [EMIM] [triflat] zusammengefasst.

4.3.1.1.1 [EMIM][EtSO₄]

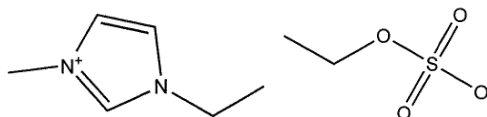


Abbildung 81: Strukturformel des 1-ethyl-3-methylimidazolium Ethylsulfat.

1-ethyl-3-methylimidazolium Ethylsulfat besitzt eine molare Masse von 472,58 g/mol. Für die Messung wurde die Verstärkung db+6 gewählt. In der

Tabelle 16 sind die Daten der Messungen aus Erlangen, die mit dem DAS 5000 durchgeführt wurden, und die der statischen Messzelle aufgeführt.

Tabelle 16: Vergleich der Werte für [EMIM][EtSO₄] bei 25 °C.

Wassergehalt der Probe [%]	URT U [m/s]	Präzision [m/s]	DSA 5000 U [m/s]
0,000	-	-	-
0,135	1.644,123	0,079	-
0,510	-	-	1.682,76
1,093	1.668,413	0,042	-
1,800	-	-	1.689,75
4,436	1.676,761	0,715	-
6,760	-	-	1.713,29
8,515	1.713,652	0,001	-
11,050	-	-	1.737,55
19,366	1.716,063	2,580	-
27,930	-	-	1.779,88
49,423	1.734,806	1,937	-
49,430	-	-	1.752,18
72,960	-	-	1.627,71
72,966	1.631,432	0,016	-

Die Messungen wurden mit noch weiter erhöhtem Schalldruck (db+12, db+18) wiederholt. Es ergab jedoch keine Verbesserung der Übereinstimmung in der Geschwindigkeitsbestimmung.

4.3.1.1.2 [EMIM][MeOHPO₂]

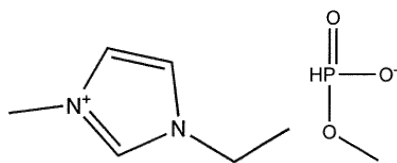


Abbildung 82: Strukturformel des 1-ethyl-3-methylimidazolium Methylphosphonat.

1-ethyl-3-methylimidazolium Methylphosphonat besitzt eine molare Masse von 206,18 g/mol. Die Messung wurde bei db+6 durchgeführt. In der Tabelle 17 sind die Daten der Messungen des DSA 5000 und die der statischen Messzelle

aufgeführt. Die Abweichungen zu den Daten der Messreihe aus Erlangen liegen im Rahmen der möglichen Konzentrationsabhängigkeit.

Tabelle 17: Vergleich der Werte für [EMIM][MeOHPO₂] bei 25 °C.

Wassergehalt der Probe [%]	URT U [m/s]	Präzision [m/s]	DSA 5000 U [m/s]
0,000	-	-	-
0,188	1.654,344	0,016	-
0,507	1.661,319	0,024	-
1,310	-	-	1.675,39
2,280	-	-	1.683,90
3,966	1.668,896	1,787	-
6,210	-	-	1.721,09
8,515	1.737,340	1,132	-
12,210	-	-	1.764,17
22,580	-	-	1.845,95
21,410	1.862,377	0,043	-
25,000	-	-	1.869,20
49,035	1.855,091	0,040	-
49,040	-	-	1.848,54
72,450	1.696,290	0,107	-
73,550	-	-	1.690,69

4.3.1.1.3 [EMIM][triflat]

1-ethyl-3-methylimidazolium trifluoromethansulfonat besitzt eine molare Masse von 260,23 g/mol.

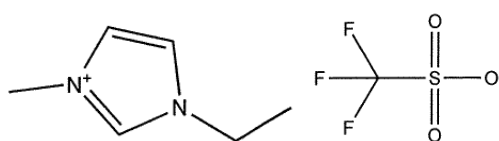


Abbildung 83: Strukturformel des 1-ethyl-3-methylimidazolium trifluoromethansulfonat.

Gemessen wurde bei db+6. Die Tabelle 18 enthält die Messdaten des DSA 5000, der statischen Messzelle und einen Literaturvergleichswert für reines [EMIM][triflat].

Tabelle 18: Vergleich der Werte für [EMIM][triflat] bei 25 °C.

Wassergehalt der Probe [%]	URT U [m/s]	Präzision [m/s]	DSA 5000 U [m/s]	Literaturwert [m/s]
0,000	-	-	-	1.435,56 ¹⁸³
0,075	1.392,718	0,008	-	-
0,160	-	-	1.437,61	-
0,819	1.385,112	0,002	-	-
0,940	-	-	1.437,31	-
4,627	1.436,305	0,012	-	-
4,900	-	-	1.453,31	-
9,588	1.433,880	0,051	-	-
9,860	-	-	1.475,57	-
24,424	1.496,661	0,036	-	-
24,620	-	-	1.526,56	-
49,467	1.537,790	0,005	-	-
49,770	-	-	1.559,46	-
74,111	1.551,613	0,012	-	-

Auch hier erbrachte die Schalldruckerhöhung auf db+12 und db+18 keine signifikante Steigerung der Messgenauigkeit.

Die Abweichungen der mit dem URT-System gemessenen Werte zu den Daten des DSA 5000 und dem Literaturwert ist erheblich. Am Beispiel der IL konnten die Grenzen des Proteinmonitors aufgezeigt werden. Die Viskosität und damit der erhöhte Schallwiderstand der Proben waren zu groß, um durch die im System vorgesehenen Schalldruckerhöhungen ausgeglichen werden zu können. Dennoch sollten weiterführende Versuche, das Feld der Charakterisierung von IL mittels Ultraschallgeschwindigkeitsanalyse erschließen.

Für das Projekt Proteinmonitor bot sich allerdings eine andere nicht wässrige Lösung durch ihre moderate Viskosität als weiterer Modellversuch an.

4.3.1.2 Triethylenglykol (TEG)

Erdgas, das durch Lagerung oder Gewinnung einen zu hohen Feuchtigkeitsgehalt für eine weitere Verwendung hat (z. B. als Heizmittel), muss getrocknet werden. Das Trocknen von Erdgas, aber auch Biogas wird industriell durch die Behandlung mit Triethylenglykol erreicht. Dabei wird das zu trocknende Gas durch die hygroskopische Flüssigkeit geleitet und gibt dabei das enthaltene Wasser an diese

ab. Es ist laut Herstellerangaben sogar möglich, durch den Einsatz verschiedener Glykole z. B. Verunreinigungen von SO_2 oder H_2S abzutrennen. Diese Trocknungssysteme sind sehr beliebt, da Triethylenglykol eine klare, farblose und geruchlose Flüssigkeit ist. Zudem ist das System in sich geschlossen, da das TEG nach dem Entfeuchten durch Aufheizen wieder regeneriert werden kann. In Abbildung 84 ist eine Entfeuchtungsanlage schematisch dargestellt ¹⁸⁴.

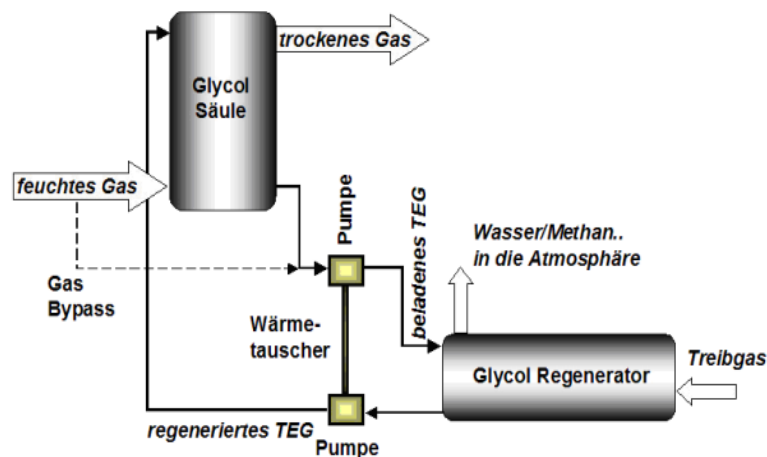


Abbildung 84: Schematischer Aufbau einer Entfeuchtungsanlage von Erdgas mittels TEG ¹⁸⁴.

Das Erdgas oder Biogas wird als feuchtes Gas in die Glycolsäule eingespeist und verlässt diese oben als trockenes Gas. Das nun beladene TEG wird in den Glycol Regenerator geleitet. Für die Regeneration des TEG wird eine Wärmequelle (bzw. Treibgas) benötigt. In der Abbildung ist dies durch das Treibgas gekennzeichnet. Das regenerierte TEG wird zurückgeleitet in die Glycolsäule und kann erneut zum Trocknen eingesetzt werden ¹⁸⁴.

Ein Problem dieser Anlagen ist die fehlende Analytik des Feuchtigkeitsgrads des TEG. Das System arbeitet in der Industrie mit Randparametern, die gewährleisten, dass das TEG in der Säule nie seinen Trocknungseffekt einbüßt, bevor es regeneriert wird. Genauso wird das TEG mit Trocknungspuffer aufgeheizt, um die vollständige Regeneration zu gewährleisten. Beides ist aufgrund der fehlenden Analytik notwendig und dadurch kostentreibend. Die Trocknungszyklen für die Glycolsäule können bei Analyse des Feuchtigkeitsgehalts des TEG optimiert werden. Längerer, kontrollierter Einsatz des TEG wäre möglich. Ebenso kann der Verbrauch an Brennstoff (bzw. Treibgas) für den Glycol Regenerator, durch

Kontrolle des Wassergehalts des TEG, optimiert werden. Die Prozessführung würde folglich durch eine passende Analytik verbessert und die Effizienz erhöht werden. Wie beschrieben ist der Proteinmonitor auf wässrige Systeme ausgelegt, aber durchaus in der Lage auch im Transfer eingesetzt zu werden. Die Grundidee der Versuchsreihe war, dass TEG je nach Wassergehalt eine unterschiedliche Ultraschallgeschwindigkeit besitzt. Um dies zu testen, wurde zunächst relativ unspezifisch der Bereich von 0-100 % Vol Wassergehalt an handelsüblichem TEG getestet (Abbildung 85). Das TEG wurde als Reinstoff gekauft und auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt und bei 25°C vermessen.

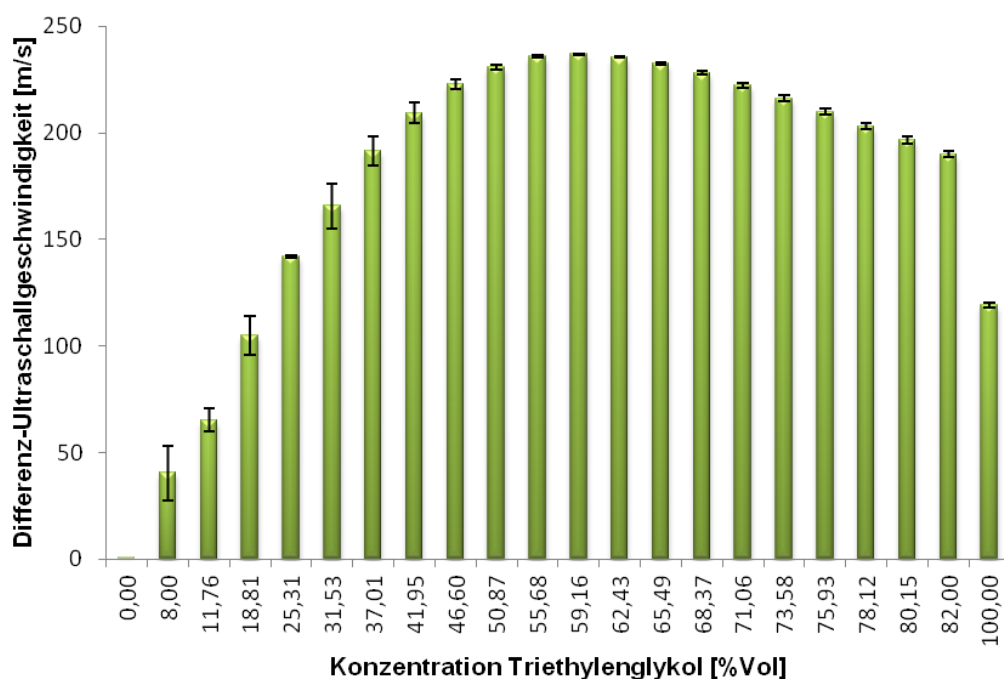


Abbildung 85: Erste Bestimmung des Zusammenhangs Wassergehalt des TEG und Ultraschallgeschwindigkeitsänderung. Gemessen wurde die Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit des wasserverunreinigten TEG gegen deionisiertes Wasser als Referenz.

Bei weiteren Untersuchungen bestätigte sich der nicht linearer Zusammenhang der Ultraschallgeschwindigkeit mit dem Mischungsverhältnis von TEG mit Wasser, wie er in Abbildung 85 gezeigt ist. TEG und Wasser sind aufgrund der Polarität von TEG gut mischbar¹⁸⁵. Es scheint dabei ein Dichtemaximum für Mischungen mit einem Gewichtsanteil von ~60 % TEG zugeben. Dieser Zusammenhang

wurde jedoch nicht weiter untersucht. Bei einer Testreihe zum Temperatureinfluss ergab sich zudem das in Abbildung 86 gezeigte Verhalten.

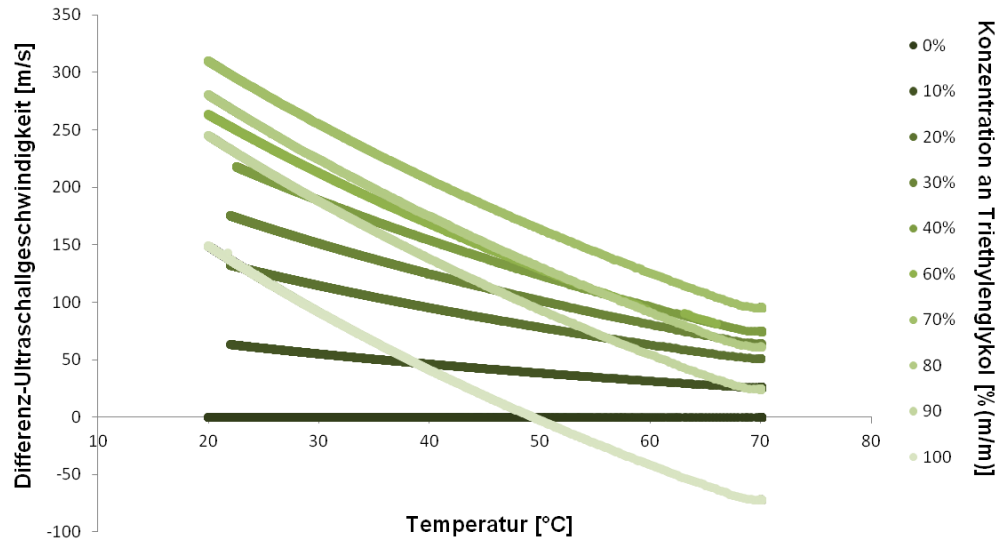


Abbildung 86: Temperatur-Ultraschallgeschwindigkeits-Zusammenhang für Mischungen von TEG mit deionisiertem Wasser. Die Farbabstufung gibt den Gehalt an TEG bzw. Wasser an. Die Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit ist gegen reines Wasser aufgetragen.

Reines TEG liefert bei 50 °C den gleichen Wert in der Ultraschallgeschwindigkeit wie reines Wasser. Durch diese Versuchsdurchführung konnten noch mehr solcher Zusammenhänge entdeckt werden, was bedeutet, dass für den Einsatz in einer Gastrocknungsanlage der Temperaturbereich besonders bei der Kalibration des Systems berücksichtigt werden muss.

Die Anforderungen an ein Messsystem für den Einsatz in einer Gastrocknungsanlage wurden anschließend genauer festgesetzt. Der abzudeckende Messbereich liegt zwischen 0,5-5 Gew-% Wasser in TEG, die mit einer Genauigkeit von 10 % des Messwertes mit einer Präzision von 0,5 % des Messwertes bestimmbar sein sollen. Die untere Messgrenze liegt dabei bei 0,5 Gew-%, bei einer geforderten Messwertauflösung von < 0,1 Gew-%. Das Messsystem muss während der Messung einem Messdruck von 1-3 bar bei Temperaturschwankungen des TEG zwischen 10-120 °C standhalten. Die eigentliche Messung soll allerdings bei Temperaturen zwischen 30-70 °C erfolgen. Die Anbindung eines Messsystems an die Trocknungsanlage könnte direkt im TEG-Fluss oder im Bypass realisiert werden.

Diesen Anforderungskatalog auf seine Realisierbarkeit durch das URT-System zu testen war die Grundlage der folgenden Messungen (Abbildung 87). Das System ist auf einen Betriebsdruck bis 2 bar ausgelegt, müsste also für 3 bar nachgerüstet werden, falls dieser Druckbereich unumgänglich ist. Der Temperaturbereich stellt hingegen, ebenso wie der Konzentrationsbereich an TEG, kein Problem dar. Die Messungen konzentrierten sich daher auf die Messgrenze und die Messauflösung im Zielbereich von 95-100 % TEG-Wasser-Mischungen. Die Messungen wurden zunächst bei 50 °C durchgeführt, da dies den Mittelwert für den Zieltemperaturbereich bildet.

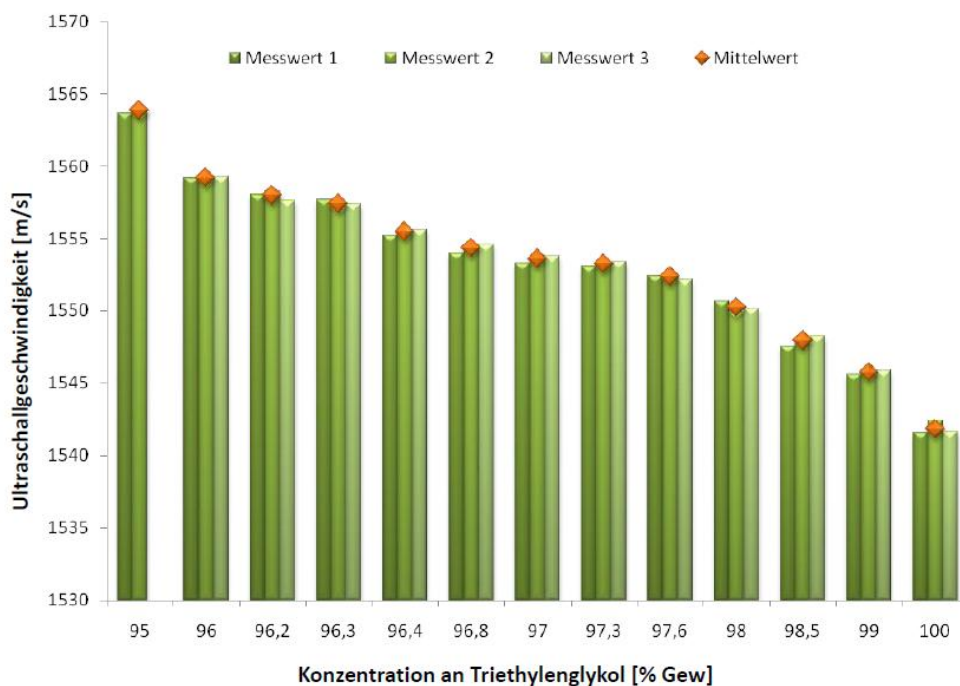


Abbildung 87: Messung im Bereich von 95-100 % TEG bei 50 °C. In Grün sind die Messwerte dargestellt und in Orange die dazugehörigen Mittelwerte. Ihre Präzision ist im Graphen auf Grund des Maßstabs nicht zu sehen.

In Tabelle 19 sind die Messwerte (MW) der drei Messreihen mit ihrem Mittelwert und der entsprechenden Präzision gezeigt. Die Präzision liegt dabei im Bereich unter 0,5 m/s. 0,5 m/s würde, bei einer Grundgeschwindigkeit von 1.541 m/s (dem Wert für reines TEG), einer Abweichung von 0,03 % bezogen auf den Gesamtwert entsprechen.

Tabelle 19: Messwerte (MW) zur Abbildung 87 der Bestimmung der erfüllbaren Randbedingungen. Die Messung erfolgte bei 50 °C, der mittleren geforderten Arbeitstemperatur.

Triethylenglykol [%]	MW 1 [m/s]	MW 2 [m/s]	MW 3 [m/s]	Mittelwert [m/s]	Präzision [m/s]
95,0	1.563,688	1.563,956	-	1.563,822	0,189
96,0	1.559,168	1.559,141	1.559,225	1.559,178	0,043
96,2	1.558,044	1.558,276	1.557,592	1.557,971	0,348
96,3	1.557,714	1.557,110	1.557,342	1.557,388	0,305
96,4	1.555,209	1.555,619	1.555,605	1.555,478	0,233
96,8	1.553,986	1.554,504	1.554,598	1.554,363	0,330
97,0	1.553,275	1.553,763	1.553,782	1.553,607	0,287
97,3	1.553,075	1.553,250	1.553,430	1.553,251	0,178
97,6	1.552,446	1.552,495	1.552,186	1.552,376	0,166
98,0	1.550,698	1.549,917	1.550,166	1.550,260	0,399
98,5	1.547,563	1.548,083	1.548,243	1.547,963	0,355
99,0	1.545,620	1.545,848	1.545,862	1.545,777	0,136
100,0	1.541,601	1.542,399	1.541,620	1.541,873	0,455

Die Genauigkeit gibt die Abweichung vom tatsächlichen Wert an. In der Literatur sind dazu verschiedene Vergleichswerte für TEG bei 25 °C zu finden. Über den Abgleich mit diesen Werten ergibt sich die Genauigkeit des URT-Systems für die Bestimmung von TEG. Da die Temperatur einen sehr hohen Einfluss auf die Ultraschallgeschwindigkeit im Medium hat, wird dem entsprechend der Wert für reines TEG aus der Messreihe bei 25 °C verwandt. In Tabelle 20 sind die Ergebnisse dazu zusammengefasst.

Tabelle 20: Genauigkeit der URT-Messung für TEG bei 25 °C. Vergleich mit Literaturdaten.

Messwert [m/s]	Temperatur [°C]	Literaturdaten [m/s]	Genauigkeit
1.615,6756	24,968	1.611,70 ¹⁸⁶	3,98 m/s \approx 0,25 %
		1.612,00 ¹⁸⁷	3,68 m/s \approx 0,23 %
		1.611,31 ¹⁸⁸	4,37 m/s \approx 0,27 %

Die Genauigkeit beträgt dabei \approx 0,3 %. Die Abweichung ist allerdings anteilig auch der Temperaturabweichung zu 25 °C von durchschnittlich 0,032 °C zuzusprechen. Dies wird im Weiteren allerdings nicht berücksichtigt, da der Wert weit unter den geforderten 10 % Messgenauigkeit liegt.

Zur Bestimmung der Auflösungsgrenze wurden die Daten der Steigung im Datenpunkt mit der Präzision der Messung in Tabelle 21 korreliert. Der Konzentrations-Ultraschallgeschwindigkeits-Zusammenhang ist nicht linear, was in einer wechselnden Steigung, je nach Messpunkt resultiert. Im untersuchten Bereich wechselt diese zwischen 0,201 m/s und 4,520 m/s. Der Mittelwert der Präzision beträgt 0,263 m/s. In Gelb sind die Wertepaare hervorgehoben, deren Steigung und Präzision so nahe beieinander liegen, dass die Auflösungsgrenze von 0,1 % aufgrund der Überschneidung von Präzision und Steigung erreicht ist.

Tabelle 21: Auswertung der Messreihe nach der Auflösungs- und Messgrenze des URT-Systems. Die Präzision der Messungen ist im Kontext zur punktuellen Steigung gezeigt.

Triethylenglykol [%]	Präzision [m/s]	punktueller Steigung [m/s]
95,0	0,189	-
96,0	0,043	-4,520
96,2	0,348	-1,124
96,3	0,305	-0,331
96,4	0,233	-2,504
96,8	0,330	-1,223
97,0	0,287	-0,711
97,3	0,178	-0,201
97,6	0,166	-0,629
98,0	0,399	-1,748
98,5	0,355	-3,135
99,0	0,136	-1,943
100,0	0,455	-4,019
mittlere Präzision:	0,263	

In Tabelle 22 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung nochmals zusammengefasst. Das ursprüngliche System ist bereits auf einen Druck bis 2 bar ausgelegt, damit erfüllt es noch nicht die geforderten 3 bar. Der für das System mögliche Temperaturbereich liegt mit 0-100 °C über dem geforderten von 30-70 °C.

Die Ansprechzeit des Systems ist von der Art des Einbaus in die Anlage abhängig. Wenn die Probenentnahme weit von der Messzelle entfernt ist, können die Bedingungen in der Anlage nicht zeitnah, sondern erst verzögert, bestimmt werden. Daher bedarf es dafür Anlagenbezogene Tests, die im Rahmen der TEG-Modellversuche nicht bearbeitet wurden.

Tabelle 22: Zusammenfassung der Ergebnisse der Kompatibilität des URT-Messsystem zum Einsatz in einer Gastrockenanlage zur Analyse des Wassergehalts des TEG.

Anforderung	URT-System	erfüllt +/-
Messdruck: 1-3 bar	2 bar	+/-
Temperaturbereich: 30-70 °C	0-100 °C	+
Messbereich: 95-100 Gew % TEG	0-100 Gew % TEG	+
Messgrenze: 0,5 Gew-%	0,1 Gew-%	+
Genauigkeit: 10 %	~0,2 %	+
Präzision: 0,5 %	< 0,5 %	+
Messwertauflösung: < 0,1 Gew-%.	0,1 Gew-%	+/-

Wie das System baulich und prozesstechnisch in eine solche Gastrockenanlage integriert werden kann wird in anderen Projektarbeiten erörtert. Dem Einsatz eines URT-Messsystems zur Kontrolle des Wassergehalts im TEG steht jedoch aufgrund der generellen Leistungsfähigkeit des Systems nichts entgegen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer Ultraschallsensorik zur On-line-Charakterisierung von Proteinen. Gezeigt wurde dazu, dass das statische URT-System der Firma TF Instruments, Heidelberg, in Kooperation zu einem Durchflusssystem und schließlich zum Proteinmonitor weiterentwickelt wurde. Die Automatisierung der Prozessschritte Messen, Spülen und Regenerieren ist beim Proteinmonitor auf Grund der Hardwareumrüstung ebenfalls möglich.

Die erforderlichen Messungen zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit, der Temperaturstabilität und der Ermittlung des für das System optimalen Volumenstroms wurden durchgeführt. Die bestimmte Präzision der Ultraschallgeschwindigkeitsmessung des Gerätes liegt im Bereich von cm/s. Diese wird auch durch die erhöhte Temperaturstabilität, auf tausendstel Kelvin genau für >24 h, erreicht. Der Volumenstrom von 0,4 mL/min resultiert in einer mittleren Verweilzeit von 30 s. Die Ansprechzeit des Systems beträgt dabei $t_{90} = 90$ s. Eine Optimierung der Messzellengeometrie und damit der Ansprechzeit sollte weiterführend im Sinne der Prozessanbindung erfolgen. Die Firma TF Instruments, Heidelberg, hat dazu im Rahmen eines anderen Projektes bereits mit Vorarbeiten begonnen.

Anhand von Salzproben konnte die Genauigkeit der Ultraschallmessung im Durchfluss im Vergleich zur statischen Messung gezeigt werden. Ebenso belegen diese Messreihen die Sensitivität der Messmethode. Salze und sogar einzelne Ionenarten schlagen sich unterscheidbar in der Veränderung der Ultraschallgeschwindigkeit nieder. Dazu wurden Vergleiche mit der Hofmeisterreihe herangezogen. Messungen unterschiedlicher Natriumsalze (Natriumiodid, -bromid, -chlorid, -hydrogencarbonat und -carbonat) unterstützen diese These.

Nach diesen Vorarbeiten wurden Arbeiten mit den Modellproteinen RNase A, α -Chymotrypsin und Lysozym durchgeführt. Dabei konnte der signifikante Einfluss der Proteingröße und -komplexität auf die Ultraschallgeschwindigkeit in wässrigen Proben belegt werden. Die Nachweisgrenzen (NWG) der gezeigten Proteine liegen im Bereich von $\mu\text{mol/L}$ und sind damit in einem ähnlichen bzw. etwas schlechteren Bereich verglichen mit optischen Methoden wie z.B. der hochauflösenden UV/Vis- oder Fluoreszenzmessung. Allerdings ist der Konzentrationsnachweis nicht Primärziel der Untersuchungen. Von entscheidendem Interesse

war daher die Beobachtung, dass das größere und komplexere α -Chymotrypsin mit einer NWG von $4,8 \cdot 10^{-6}$ mol/L im Ultraschall feiner detektierbar ist, als das kleinere und konformativ einfachere RNase A, dessen NWG bei $8,76 \cdot 10^{-6}$ mol/L liegt. Für den Einfluss des Proteins auf die Ultraschallgeschwindigkeit konnte somit belegt werden, dass die Größe und Konformation entscheidend sind.

Das Verhalten des Proteinsignals bei Zugabe verschiedener Cosolventien (Kaliumsulfat, Ethanol und Harnstoff) wurde ebenso untersucht wie der Einfluss verschiedener pH-Werte. Die pH-Wert Untersuchungen belegten eine tendenziell gleichbleibende Nachweisbarkeit für die Proteine α -Chymotrypsin und Lysozym. Die Zugabe von Kaliumsulfat zeigte keine signifikanten Veränderungen des Proteinsignals, da bewusst der Konzentrationsbereich des Aussalzens vermieden wurde. Ethanol als polares Lösemittel erzeugt bereits in geringen Konzentrationen von 0,5 mol/L durch die Erniedrigung der Polarität des Lösemittels Wasser eine Reaktion der Proteinstruktur. In geringen Konzentrationen ist im Vergleich dazu der Effekt des Harnstoffs noch nicht sehr ausgeprägt. Zum Effekt der Konformationsänderungen von Proteinen auf die Schallgeschwindigkeit wurden daher zusätzlich thermische und konzentrationsabhängige Denaturierungsvorgänge untersucht. Für die konzentrationsabhängige Denaturierung wurde bis zu 9 mol/L Harnstoff einer Lysozymlösung hinzugefügt, um die Proteinstruktur zu denaturieren. Die Fluoreszenzmessungen stützen die erhaltenen Ergebnisse. Die thermische Denaturierung zeigte das Einbrechen der Proteinstruktur bei den aus der Literatur erwarteten Werten. Somit konnte die Ultraschallmessung als Konformationsmessmethode erfolgreich belegt werden.

Die Betriebsparameter der Versuche mit Modellproteinen wurden in die Arbeiten mit Realproben übernommen. Im Falle der Untersuchungen der Kartoffelprotein-Aufreinigung konnte anhand eines bereits im Technikumsmaßstab arbeitenden Downstreamprocessing Schrittes die mögliche Kompatibilität zu dieser Art von Prozessführung gezeigt werden. Damit ist belegt, dass bereits bestehende Prozessschritte mit dem Proteinmonitor optimiert werden können. Die Analyse von PDGF-BB, einem Wachstumsfaktor, der bereits kommerziell vertrieben wird, zeigt eine mögliche Erweiterung des Einsatzfeldes des Proteinmonitors auf analytische Fragestellungen und damit die Qualitätssicherung bestehender Produkte.

Die Untersuchungen zu „nicht wässrige Systeme“ unterstreicht die Vielseitigkeit der Einsatzmöglichkeiten des Proteinmonitors. Im Falle der Ionischen

Flüssigkeiten wäre das bestehende System so nicht verwendbar. An den Messungen mit dem weniger viskosen Triethylenglykol (TEG) zeigt sich jedoch, wie viel Information der Parameter Ultraschallgeschwindigkeit enthalten kann. Die hierzu präsentierten Daten bilden die Grundlage einer anderen Applikation für ein URT-System. Mit der Ansprechzeit $t_{90} = 90$ s, der Messgenauigkeit von $\sim 0,2$ % mit einer Präzision von $> 0,5$ % erfüllt das System bereits jetzt ohne weitere Anpassungen an den Prozess die Grundvoraussetzungen um in der Gastrocknung als Analysegerät eingesetzt zu werden. Eine Anwendungsbezogene Systemoptimierung ist in diesem Fall genauso wie für die Anbindung an biotechnologische Prozesse als weiterführender Schritt notwendig.

Die vorliegende Arbeit führte zum Bau und Einsatz eines Prototyps des Proteinmonitors. Obwohl die Arbeiten am Proteinmonitor zum Abschluss dieser Arbeit noch nicht beendet sind, zeigen die präsentierten Daten das große Anwendungspotential dieser Technik. Dabei lassen sie auf einen baldigen Einsatz und eine zügige Weiterentwicklung der technischen Möglichkeiten hoffen. Die Grundlage der Technik ist geschaffen und Anwendungsbereiche im Downstreamprocessing (Überwachung, Aufklärung) und abseits der Biotechnologie (TEG-Analyse) wurden identifiziert und erfolgreich getestet.

Der Proteinmonitor muss nun durch Untersuchungen zur anwendungsbezogenen Prozessanbindung weiterentwickelt und optimiert werden.

6 Anhang

6.1 Dialyseeinheit

Die Messungen im Durchfluss sind auf den Downstreambereich und seine Bedingungen ausgerichtet. Primär ist die Zustandserkennung von verschiedenen Konformationen von Proteinen von Interesse. Unter Punkt „4.2.5 Proteinanalyse mittels Ultraschall“ wurde auf die Problematik der geringen Ultraschalldifferenzen für die gegebenen Proteinkonzentrationen eingegangen. Um die Messgenauigkeit und damit die Auflösung zu erhöhen wurden Dialyseeinheiten verwandt. Die von TRACE Analytics (Braunschweig, Deutschland) entwickelt und gebauten Prototypen sind beispielhaft in Abbildung 88 gezeigt. Es wurden für diese Arbeit verschieden lange Module mit variierender Faseranzahl eingesetzt.



Abbildung 88: Zwei Beispiele für Prototypen der Dialyseeinheiten der Firma TRACE Analytics, die für dieses Projekt gebaut wurden. Die Zahl gibt die Anzahl der Fasern an.

Die gezeigten Modelle sind bisher nicht käuflich erwerbbar. Sie sind mit sehr feinen Fasern aus Polyethersulfon¹⁸⁹ bestückt. Dies führt einerseits zu einer großen Dialysefläche, andererseits können diese Module jedoch leicht verstopfen. Im Prozessmonitor und für Downstreambedingungen stellt dies aber kein Problem dar. Große Zellbestandteile wurden schon vorher durch z. B. Zentrifugation der Lösung entzogen. Abbildung 89 zeigt die beiden Enden eines Moduls. Die Fasern sind mit Klebstoff im Gehäuse fixiert. Die Fasern sind für die Anwendung zum Abgleichen der Probe und des Hintergrunds besonders gut geeignet, da sie für Proteine nur unter einer Größe von 50 kDa¹⁸⁹ durchlässig sind. Alle anderen Bestandteile können die Fasern ungehindert passieren, so dass der Hintergrund

optimal ausgeglichen werden kann. Die Dialyseleistung hängt dabei von der Dialysestrecke und der Pumpgeschwindigkeit ab.

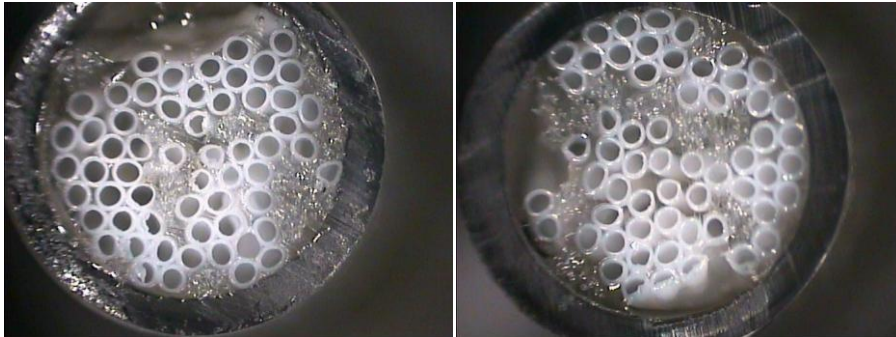


Abbildung 89: Von der Firma TRACE zur Verfügung gestellte Mikroskopaufnahmen der Enden eines Dialysemoduls der Firma TRACE ¹⁹⁰.

Die Abbildung 90 zeigt den feiner aufgelösten Auslass der Fasern, der zur Ausmessung der Faserdurchmesser verwandt wurde. Die eingesetzten Fasern sind mit einem Innendurchmesser von $\sim 0,18$ mm und einem Außendurchmesser von $0,28$ mm sehr flexibel. Dadurch ist es möglich Dialysemodule mit großer Faseranzahl zu verwirklichen, was einer sehr großen Dialysefläche entspricht.

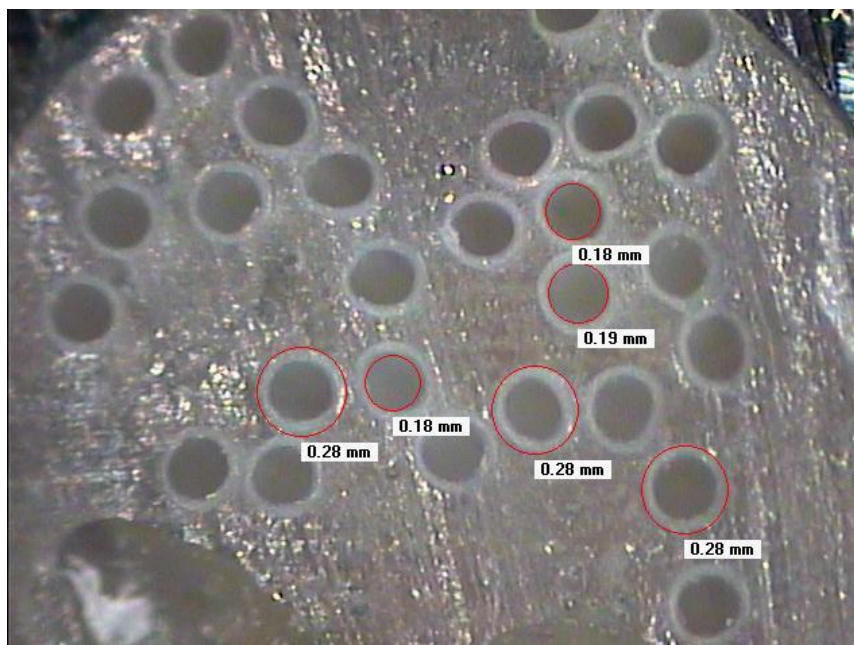


Abbildung 90: Zur Verfügung gestellte Aufnahmen der Bestimmung der Durchmesser der, im Dialysemodul eingesetzten, Hohlfasern ¹⁹⁰.

Die Prototypen waren noch nicht für einen Dauereinsatz im Labor ausgelegt. Deshalb kam es immer wieder dazu, dass eins dieser Unikate durch mechanische Belastung irreparabel beschädigt wurde und ersetzt werden musste. Auf die eingesetzten Dialysemodule wird in den Versuchsbeschreibungen, bei denen sie zum Einsatz kamen, eingegangen.

6.2 Blasenfallen und Degasser

Die eingesetzten Blasenfallen, TRACE TRAP, sind von der Firma TRACE Analytics (Braunschweig, Deutschland). Sie bestehen aus zwei gefrästen Kunststoffringen, die mit einer Membran dazwischen fest verschraubt werden. Im unteren Ring sind Hohlräume mit Auslässen eingebracht. Diesen Hohlräumen gegenüber sind, durch die Membran getrennt, Hohlräume im oberen Kunststoffring. Diese werden mit dem Fluid durchströmt. Es ist möglich zwei Ströme parallel über die Membran zuleiten, da es zwei Ein- und Auslässe mit Verschraubungen gibt. Durch das Anlegen eines 2 bar Gegendrucks wird eventuell gelöstes Gas durch die gasdurchlässige Membran vom oberen Ring in die Hohlräume des unteren gedrückt. Hier entweicht das Gas durch die Auslässe.

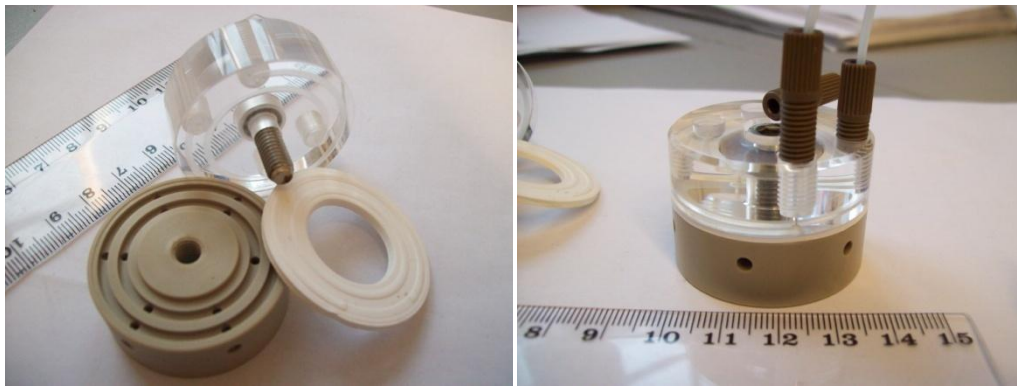


Abbildung 91: Blasenfallen der Firma TRACE, TRACE TRAP. Links ist die auseinandergebaute Falle zu sehen und rechts ist die funktionsfähige gezeigt.

Da es sich für das Messsystem als unpraktisch erwiesen hat mit Gegendruck arbeiten zu müssen, wurden die TRACE TRAPS durch einen Degasser ersetzt. Angedacht ist es einen entsprechenden Umbau der Blasenfallen auf Grund ihrer praktischen Größe vorzunehmen. Sie sind nur 4 cm im Durchmesser und 3 cm hoch und wären damit als Bauteil für den Proteinmonitor sehr platzsparend. Durch das Anlegen eines Unterdrucks an die Auslässe des unteren Rings wird der gleiche

Effekt des Entgasens erhalten, wie beim Ausüben eines Überdrucks auf die Probe im oberen Ring. Dadurch müsste nicht das ganze System unter Druck stehen. Ähnlich wie es auch im verwendeten Degasser ausgenutzt wird.

Der eingesetzte Degasser nutzt, wie im Abschnitt 4.1 beschrieben, ebenfalls Unterdruck zum Entgasen. Das Besondere des gewählten Degassers ist, dass er ein für den Markt untypisches, für unser System aber notwendiges, Kammervolumen von nur 0,5 ml hat. Die Bestrebungen gehen dahin, dass in Kooperation ein Degasser mit einem Kammervolumen von weniger als 0,5 ml gebaut wird. Zum einen soll der Degasser als Bestandteil des Prozessmonitors fest mit eingebaut sein, d. h. im Gehäuse des Prozessmonitors sollte er möglichst wenig Raum einnehmen. Zum anderen beträgt das Volumen der Messzellen $< 0,2$ ml. Ein Degasser mit dem gleichen oder sogar kleineren Volumen gewährleistet sowohl eine Verringerung der Rückvermischung als auch der Zeitverzögerung der Messung. Das Volumen des Degasser wird für die Ansprechzeit des Systems als Totzeit gerechnet. In Abbildung 92 ist der eingesetzte Degasser gezeigt.

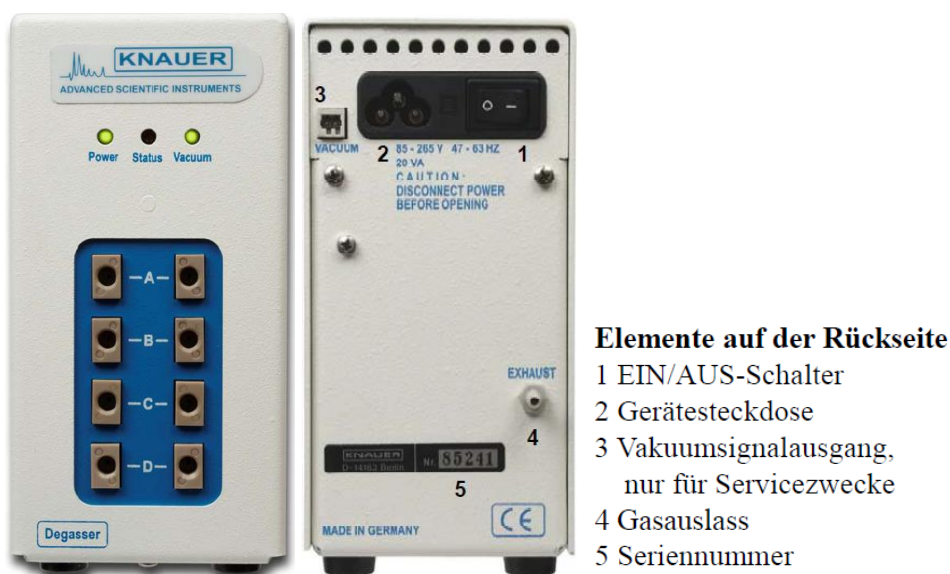


Abbildung 92: Degasser der Firma KNAUER, der im Proteinmonitor zum Einsatz kommt ¹⁹¹.

Das Funktionsprinzip des Onlinedegassers beruht auf dem Durchleiten der Lösung durch eine Teflontgasungsleitung. Dieses Stück Teflon AF® Leitung befindet sich in einer Vakuumkammer. Dem Schema in Abbildung 93 folgend werden gelöste Gase aus der Lösung durch die Teflonleitung in die Vakuumkammer

ausgetrieben. Bei dem eingesetzten Degasser handelt es sich um einen Vier-Kanal-Degasser, wie in der Abbildung 92 gezeigt. Daher ist es möglich gleichzeitig vier Lösungsströme separat, parallel zu entgasen. Damit können die Lösungen der Referenz und Probe mit einem Degasser gleichzeitig vor der Dialyse und vor den Messzellen entgast werden. Das zusätzliche Entgasen vor der Dialyse erhöht die Dialyseleistung.

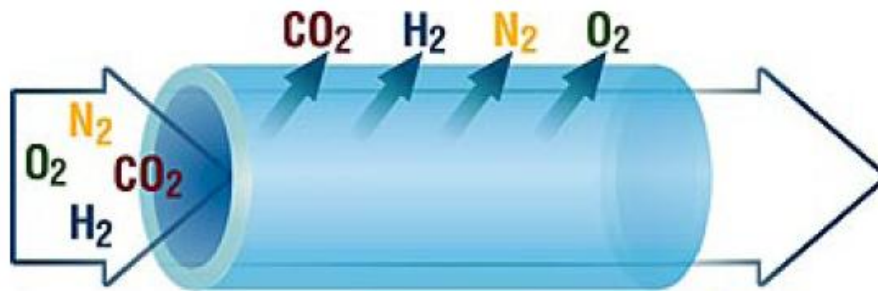


Abbildung 93: Schema des Entgasungsprinzips¹⁹¹. Zu sehen ist die Teflonhülse, durch die die Gase durch den Unterdruck die Lösung verlassen.

Das Vakuum der Kammer wird durch eine ständig auf niedriger Drehzahl laufende Vakuumpumpe konstant gehalten. So verlässt das entfernte Gas den Degasser über den Auslass (4), der in Abbildung 92 auf dem rechten Bild gezeigt ist.

Der Degasser hat ein passendes, wenn auch nicht optimales, Volumen für die Anwendung im Prozessmonitor. Einzig seine Größe macht ihn als Bauteil unflexibel und platzraubend.

6.3 Das Arbeiten mit den Messgeräten

Wie in Abschnitt 4.1 beschrieben durchlief sowohl der Messaufbau, als auch die Messsoftware eine kontinuierliche Entwicklung. Den folgenden Beschreibungen sind die Funktionsweisen der einzelnen Geräte, in den verschiedenen Stufen zu entnehmen.

6.3.1 Messung mit der statischen Zelle und der Durchflusszelle mit der ursprünglichen Software von TF-Instruments

Das Grundprinzip der Messung wurde im Theoretischen Teil (siehe Abschnitt 3) beschrieben. Die piezoelektrischen Kristalle innerhalb der Messzellen des Resonators werden zum Schwingen angeregt. Damit wird die Ultraschallwelle induziert.

Ihre Frequenz kann über die Kontrolleinheit des Resonators um einen Bereich von ca. 1 MHz variiert werden. Wie beschrieben sind nur die Frequenzen f von Interesse, für die gilt, dass das ganzzahlige Vielfache der halben Wellenlänge λ dem Abstand D zwischen Generator und Reflektor entspricht. Da dann die gegenläufigen Wellen nach der Reflektion eine stehende Welle ausbilden. Die Anzahl der Knotenpunkte der Welle beträgt $n+1$ und wird als Peakorder vom Messgerät ausgegeben. Die Amplitude, die Änderung der Schwingungsphase zwischen Generator und Reflektor und die Abschwächung der akustischen Welle werden ebenfalls vom Gerät bestimmt. Sie dienen der Berechnung der Resonanzfrequenz und der Ultraschallgeschwindigkeit. Das Grundsystem URT zeichnet sich dabei durch seine Messgenauigkeit aus. Die Auflösung beträgt 3 Hz gegenüber einer Resonanzfrequenz von 10 MHz.

Innerhalb der beiden Messzellen eines Messgeräts werden die Probenpaare parallel auf ihre Ultraschallgeschwindigkeit vermessen. Vor der Messung wird eine Initialisierung durchgeführt. Dabei werden vom Gerät nacheinander Ultraschallwellen unterschiedlicher Frequenzen erzeugt. Für diese werden die Peakorder, die maximale Amplitude und die Abschwächung des Signals bestimmt. Die Daten werden ausgegeben, so dass manuell, für jede Messzelle gesondert, die optimale Frequenz ausgewählt werden kann. Die gewählte Frequenz sollte eine Amplitude zwischen 100.000 und 120.000 haben, um dem Modell, welchem die Messmethode zugrunde liegt, möglichst genau zu entsprechen. Mit dieser Frequenz werden bis zur nächsten Initialisierung die Messungen durchgeführt. Bei der Software von TF Instruments wird die Ultraschallgeschwindigkeit in beiden Zellen alle 10 s gemessen und abgespeichert. Die Differenz der Ultraschallgeschwindigkeiten beider Messzellen ergibt die eigentliche Ultraschallgeschwindigkeit zugehörig zu der Probe. Die Ultraschallgeschwindigkeiten werden dabei wie beschrieben aus den Daten berechnet. Neben den Absolutwerten wird daher auch die Differenz ausgegeben.

6.3.2 Messung mit der statischen Zelle, der Durchflusszelle und dem Proteinmonitor mit der neuen Software

Bei der neuen Software fällt der manuelle Schritt bei der Auswahl der Messfrequenz weg. Die Software wählt während der Initialisierung selbstständig die optimale Frequenz. Dadurch entfällt zwar für den geschulten Anwender die Möglichkeit direkt einzugreifen, aber das Gerät ist so auch für ungeschulte Anwender

geeignet. Dadurch wird damit die Anwenderfreundlichkeit erhöht. Die Funktionsweise der Messung hat sich grundsätzlich nicht verändert. In der neuen Software ist zusätzlich eine Pumpensteuerung integriert. Mit dieser kann bei den Durchflusssystemen, auch dem Proteinmonitor, die Pumpgeschwindigkeit der Schlauchquetschpumpe gesteuert werden. Das Thermostat des Proteinmonitors wird ebenfalls über die Software gesteuert. Dazu erhält die Software Temperaturmessdaten sowohl aus der Messzelle, als auch aus dem Innenraum des Gehäuses des Proteinmonitors. Beim Durchflussgerät wird der Thermostat manuell bedient und das Messgerät kann lediglich kleine Schwankungen über die Kontrolle der Messzellentemperatur aktiv ausgleichen. Dies ist auch beim statischen, lufttemperierten Gerät der Fall.

Für eine Messung ist wie mit der ursprünglichen Software zuerst eine Initialisierung auf die Probe notwendig. Anschließend kann die Messung gestartet werden.

6.3.3 Vorschrift zur Benutzung der statischen Zelle

Um Verunreinigungen der Messzellen vor jeder Versuchsreihe auszuschließen, wird auf übereinstimmende Grundmesswerte beider Messzellen geprüft. Dazu werden diese mit jeweils 180 μL deionisiertem Wasser befüllt und verschlossen. Bei einer Abweichung der Nullwerte vom erwarteten Grundwert werden die Zellen mit der mitgelieferten Reinigungsapparatur gesäubert und anschließend mit deionisiertem Wasser gespült. D. h. die Messzellen werden mehrmals mit deionisiertem Wasser befüllt und das Wasser wird danach durch die Reinigungsapparatur abgesaugt. Diese Prozedur wird wiederholt bis die Nullwerte übereinstimmen.

Zudem wurden zu Beginn jeder Versuchsreihe beide Messzellen jeweils zweimal mit 180 μL der verwendeten Lösung gespült und anschließend mit jeweils 180 μL der Lösung befüllt und verschlossen. Diese Prozedur wurde bei jedem Wechsel der Lösungen durchgeführt. Je nach Software wird danach entsprechend die Messung gestartet.

Die Messzellentemperierung erfolgt vom Gerät gesteuert kontinuierlich auf die eingestellte Zieltemperatur. Die Temperatur wird dabei vom Gerät auf ein tausendstel $^{\circ}\text{C}$ genau bestimmt. Da die Temperierung des statischen Gerätes von der Umgebungsluft abhängig ist, wurde die Temperatur in den Laborräumen möglichst auf der Messtemperatur, meist von 25 $^{\circ}\text{C}$, gehalten. Dadurch sollten Temperaturgradienten vermindert werden. Bei den Thermostat temperierten Durchflussgeräten wird darauf verzichtet. Nach jeder Messung erfolgte die Absaugung des

Inhalts der Messzelle durch die mitgelieferte Apparatur. In der Messzelle 1 verblieb während einer Messreihe das Lösungsmittel, bzw. der Hintergrund, als Referenz.

Nach Beendigung der Messungen wurden die Messzellen mit deionisiertem Wasser gründlich gespült. Um eine Austrocknung der Messzelle zu verhindern, wurde es in den Messzellen bis zur nächsten Messung belassen.

6.3.4 Vorschrift zur Benutzung des Durchflussgeräts und des Proteinmonitors

Wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben wurden die ersten Versuche zur Durchflussmessung mit einer Dosierpumpe gemacht. Messzelle 1 war während aller Messungen mit deionisiertem Wasser befüllt. Messzelle 2 ist die tatsächliche Durchflussmesszelle. Die zu vermessenden Proben wurden in herkömmlichen 15 ml Reaktionsgefäßen bzw. 50 ml (Greiner, Deutschland) bereitgestellt. Die Dosierpumpe zog über einen Schlauch immer 2 mL Probe auf. Zuerst wurde die aufgezogene Probenmenge schneller durch die Messzelle gedrückt, um diese zu spülen und wie beim stationären Gerät, die beste Ultraschallfrequenz für die Messung zu ermitteln. Diese wurde am angeschlossenen PC ausgewählt.

Für die eigentliche Messung wurden erneut 2 mL Probe aufgezogen und diese dann mit einer Geschwindigkeit von 160 $\mu\text{L}/\text{min}$ durch die Zelle gespült. Zur Reinigung der Messzelle, wurde anstatt Probe deionisiertes Wasser eingesetzt und damit die Zelle gespült. Gereinigt wurde die Messzelle immer zwischen zwei verschiedenen Konzentrationen.

6.3.5 Initialisierung

Bei der Initialisierung wird das Reflexionsverhalten der Parameter Flüssigimpedanz (z_L) ($z_L = [\rho(T, \sum c), \kappa(T, \sum c), T]$) und Piezoimpedanz (z_T) ($z_T = [\rho(T), \kappa(T), T]$) bestimmt. Mit diesen Werten wird nach der Initialisierung gerechnet. Sie werden allerdings während der Messung als konstant angesehen. Den Formeln entsprechend sind diese Parameter von der Konzentration (c) und der Temperatur (T) abhängig. Somit ist die Annahme der Konstanz für die Flüssigimpedanz (z_L) und die Piezoimpedanz (z_T) für sich ändernde Temperatur- oder Konzentrationsbedingungen während einer Messung nicht richtig. Dies kann zu gravierenden Fehlbestimmungen der Ultraschallgeschwindigkeit führen. Diese

Problematik wurde im Projekt erkannt und Abbildung 94 zeigt die jüngsten Entwicklungen dazu.

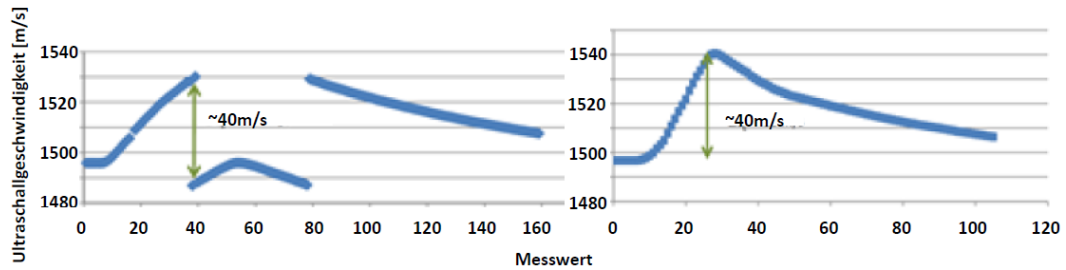


Abbildung 94: Im linken Graphen ist die Ultraschallgeschwindigkeitsmessung einer Probe mit großem Konzentrationsgradienten gezeigt. Das Bestimmungsmodell versagt vor dem Erreichen der maximal Konzentration. Die gewählte Frequenz ist nicht länger die korrekte Messfrequenz. Im rechten Bild ist gezeigt, wie die letzten Entwicklungen der Software durch das Erkennen eines Messfrequenzwechsels, das Messen größerer Konzentrationsbereiche ohne Zwischeninitialisierung ermöglichen.

6.3.6 Berechnungen

Im Folgenden sind die genutzten Grundlagen zur Berechnung der Genauigkeit, der Präzision und der Nachweisgrenze aufgeführt. Sie wurden den in der Chemo-metrie üblichen Verfahren entsprechend bestimmt ¹⁹².

6.3.6.1 Genauigkeit und Präzision

Die Genauigkeit (e) ist definiert als Summe aus der Präzision ($x - \bar{x}$) und der Richtigkeit ($\bar{x} - x_W$).

$$e = (x - \bar{x}) + (\bar{x} - x_W) \quad (8)$$

Die Präzision gibt dabei den Zufallsfehler an als Differenz aus dem Wert (x) und dem Mittelwert (\bar{x}).

Sie wird über die Standardabweichung (s) berechnet nach Gleichung 9.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (9)$$

Die Richtigkeit bestimmt den systematischen Fehler aus der Differenz des Mittelwerts (\bar{x}) und des wahren Werts (x_W). Sie wird über die Wiederfindungsrate (WFR) nach Gleichung 10 berechnet.

$$WFR(\%) = \frac{\bar{x}}{x_W} \cdot 100 \quad (10)$$

6.3.6.2 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (NWG) bezeichnet die gerade noch bestimmbare Konzentration. Der Blindwert (B) ist der korrigierte Ordinatenabschnitt (b_0). Über ihn lässt sich nach Gleichung 11 der Wert y_{NWG} bestimmen.

$$y_{NWG} = y_B + 3s_B \quad (11)$$

Der Mittelwert des Blindwerts (y_B) wird dabei herangezogen und seine Standardabweichung (s_B). Da der Wert für s_B durch die begrenzte Anzahl an Messungen eher geschätzt ist wurde der Faktor 3 als Sicherheit eingefügt.

Die Konzentration an der Nachweisgrenze (x_{NWG}) berechnet sich nach Gleichung 12.

$$x_{NWG} = \frac{y_{NWG} + b_0}{b_1} \quad (12)$$

Aus der Kalibrierfunktion für lineare Zusammenhänge in Gleichung 13 sind b_0 als Ordinatenabschnitt (nicht korrigierter Blindwert) und b_1 als Empfindlichkeit bekannt.

$$y = b_0 + b_1 \cdot x \quad (13)$$

6.3.7 Herstellung der Verdünnungsreihen

Für die Verdünnungsreihen wurden 1 mol/L Stammlösungen der Cosolventien angesetzt. Bei den Proteinproben wurden 1 g/L Stammlösungen vorgelegt.

Die gewünschte Substanz wurde eingewogen, auf die entsprechende Menge aufgefüllt und unter Rühren bzw. Schütteln gelöst.

Für das statische Gerät wurden jeweils 2 mL Probe, für das Durchflussgerät 30 ml Probe angesetzt.

6.4 Ergänzung der Messdaten zum Praktischen Teil

Tabelle 23: Verwendete Literaturdaten und daraus berechnete Werte der Ultraschallgeschwindigkeit in Wasser für den Temperaturbereich von 0-100 °C.

Temperatur [°C]	Kompressibilität [Pa ⁻¹] ⁵	Dichte [kg/m ³] ⁵	U berechnet [m/s]
0,00	5,083E-10	999,84	1402,732
1,00	5,0468E-10	999,9	1407,712
2,00	5,0119E-10	999,94	1412,576
3,00	4,9783E-10	999,96	1417,321
4,00	4,9458E-10	999,97	1421,963
5,00	4,9144E-10	999,96	1426,505
6,00	4,8842E-10	999,94	1430,923
7,00	4,855E-10	999,9	1435,248
8,00	4,8269E-10	999,85	1439,456
9,00	4,7997E-10	999,78	1443,580
10,00	4,7735E-10	999,7	1447,594
11,00	4,7482E-10	999,6	1451,518
12,00	4,7238E-10	999,5	1455,335
13,00	4,7002E-10	999,38	1459,071
14,00	4,6775E-10	999,24	1462,710
15,00	4,6556E-10	999,1	1466,249
16,00	4,6345E-10	998,94	1469,701
17,00	4,6141E-10	998,77	1473,071
18,00	4,5944E-10	998,59	1476,359
19,00	4,5755E-10	998,4	1479,546
20,00	4,5572E-10	998,2	1482,662
21,00	4,5396E-10	997,99	1485,690
22,00	4,5227E-10	997,77	1488,627
23,00	4,5063E-10	997,54	1491,505
24,00	4,4906E-10	997,29	1494,298
25,00	4,4755E-10	997,04	1497,004
26,00	4,4609E-10	996,78	1499,647
27,00	4,447E-10	996,51	1502,193
28,00	4,4335E-10	996,23	1504,689
29,00	4,4206E-10	995,94	1507,103
30,00	4,4082E-10	995,64	1509,448
31,00	4,3963E-10	995,34	1511,717
32,00	4,3849E-10	995,02	1513,925
33,00	4,374E-10	994,7	1516,054

34,00	4,3635E-10	994,37	1518,128
35,00	4,3535E-10	994,03	1520,131
36,00	4,344E-10	993,68	1522,060
37,00	4,3348E-10	993,32	1523,951
38,00	4,3261E-10	992,96	1525,759
39,00	4,3178E-10	992,59	1527,509
40,00	4,31E-10	992,21	1529,183
45,00	4,2763E-10	990,21	1536,747
50,00	4,2516E-10	988,03	1542,903
55,00	4,235E-10	985,69	1547,758
60,00	4,2259E-10	983,19	1551,392
65,00	4,2238E-10	980,55	1553,866
70,00	4,2281E-10	977,76	1555,290
75,00	4,2387E-10	974,84	1555,668
80,00	4,2551E-10	971,79	1555,102
85,00	4,2772E-10	968,61	1553,623
90,00	4,3048E-10	965,3	1551,288
95,00	4,3378E-10	961,88	1548,121
100,00	4,376E-10	958,35	1544,185

Tabelle 24: Auszug der Daten der Ultraschallgeschwindigkeitsmessung von Wasser im Bereich von 10-80 °C.

Temperatur [°C]	Ultraschallgeschwindigkeit [m/s]	11,492	1452,6275	24,962	1496,3441	64,931	1553,642
5,968	1430,4994	11,541	1452,8154	25,026	1496,4768	64,977	1553,662
5,968	1430,4975	11,589	1453,0046	25,073	1496,6106	65,024	1553,6811
5,969	1430,4972	11,637	1453,1937	25,12	1496,7426	65,092	1553,6998
5,969	1430,4973	11,684	1453,3822	25,168	1496,8741	65,141	1553,7192
5,97	1430,4992	11,732	1453,5698	25,218	1497,0051	70,73	1555,1941
5,971	1430,5015	11,795	1453,7573	25,81	1498,5746	70,779	1555,2
6,189	1431,4276	11,842	1453,9432	25,857	1498,7051	70,827	1555,2078
6,194	1431,4516	11,889	1454,1284	25,905	1498,8337	70,873	1555,2141
6,2	1431,4748	11,937	1454,3119	25,954	1498,9621	70,92	1555,221
6,205	1431,4986	11,986	1454,4961	26,002	1499,0911	70,968	1555,2281
6,21	1431,5225	12,034	1454,6811	26,05	1499,2214	71,018	1555,2342
6,216	1431,5465	12,082	1454,8675	29,862	1508,6057	71,066	1555,2409
6,222	1431,5708	12,129	1455,053	29,91	1508,7209	74,035	1555,4589
6,227	1431,5956	12,177	1455,2379	29,957	1508,837	74,096	1555,4602
6,233	1431,6204	12,225	1455,4221	30,004	1508,9519	74,143	1555,4603
6,988	1434,9188	13,862	1461,4461	30,934	1511,0933	74,192	1555,4607
6,992	1434,9324	13,909	1461,624	30,997	1511,2052	74,24	1555,4613
6,995	1434,9458	13,957	1461,8011	31,045	1511,3156	74,287	1555,4612
6,999	1434,9595	14,005	1461,9784	31,096	1511,4254	74,334	1555,4611

7,002	1434,9734	14,051	1462,1546	31,145	1511,5363	74,382	1555,4618
7,005	1434,9874	14,099	1462,3297	36,971	1523,4535	74,432	1555,4618
7,008	1435,0009	14,146	1462,5036	37,019	1523,545	74,482	1555,4613
7,011	1435,0148	14,211	1462,6777	37,066	1523,6379	74,531	1555,4611
7,015	1435,0289	16,966	1472,2636	37,113	1523,729	74,577	1555,4606
7,018	1435,0428	17,013	1472,4258	45,886	1537,6376	74,64	1555,4606
7,022	1435,0571	17,06	1472,5875	45,951	1537,7023	74,689	1555,4602
7,026	1435,0715	17,11	1472,749	46	1537,7672	74,739	1555,4597
7,029	1435,0859	18,887	1478,5354	46,048	1537,8324	74,787	1555,4588
8,867	1442,2227	18,934	1478,691	50,973	1543,6896	74,881	1555,4575
8,916	1442,4272	18,981	1478,8452	51,039	1543,7416	74,93	1555,4564
8,965	1442,6311	19,029	1478,9984	51,087	1543,7938	74,98	1555,4555
9,014	1442,834	19,078	1479,1518	54,929	1547,4575	75,028	1555,4535
9,064	1443,0363	19,142	1479,3073	54,979	1547,4989	75,075	1555,4524
9,112	1443,2395	20,922	1484,8042	55,027	1547,5412	79,971	1554,85
9,161	1443,443	20,969	1484,9529	55,074	1547,5837	79,981	1554,8462
9,209	1443,646	21,017	1485,1007	59,919	1551,118	79,996	1554,8414
9,258	1443,8466	21,066	1485,2482	59,968	1551,1479	80,002	1554,8392
9,954	1446,637	22,943	1490,735	60,018	1551,1775	80,008	1554,8374
10,019	1446,8371	22,991	1490,8742	60,066	1551,2082	80,013	1554,8358

6.4.1 Messdatenreihen mit Bestimmtheitsgrad der Salzmessungen aus 4.2.4

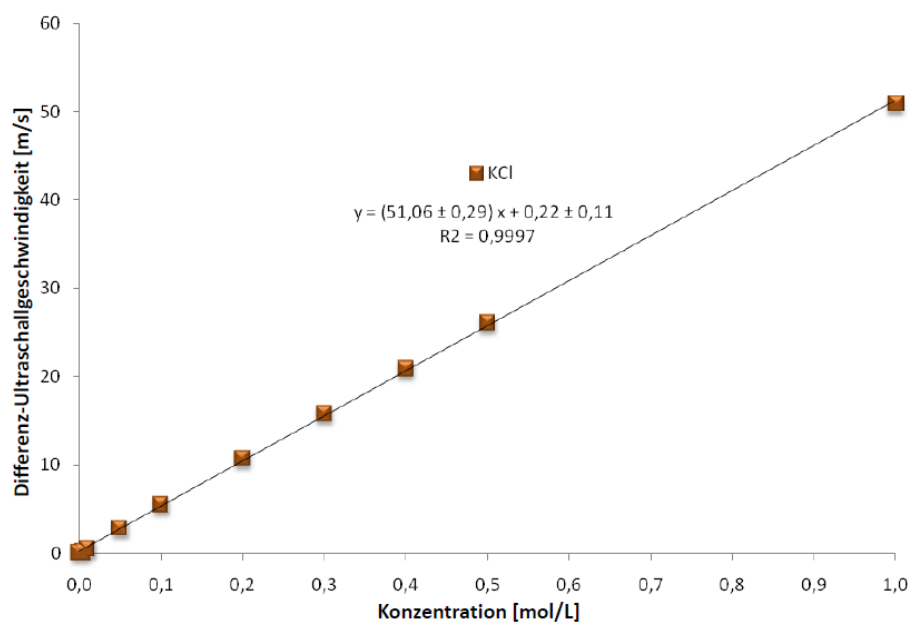


Abbildung 95: Messung der Kaliumchlorid-Proben.

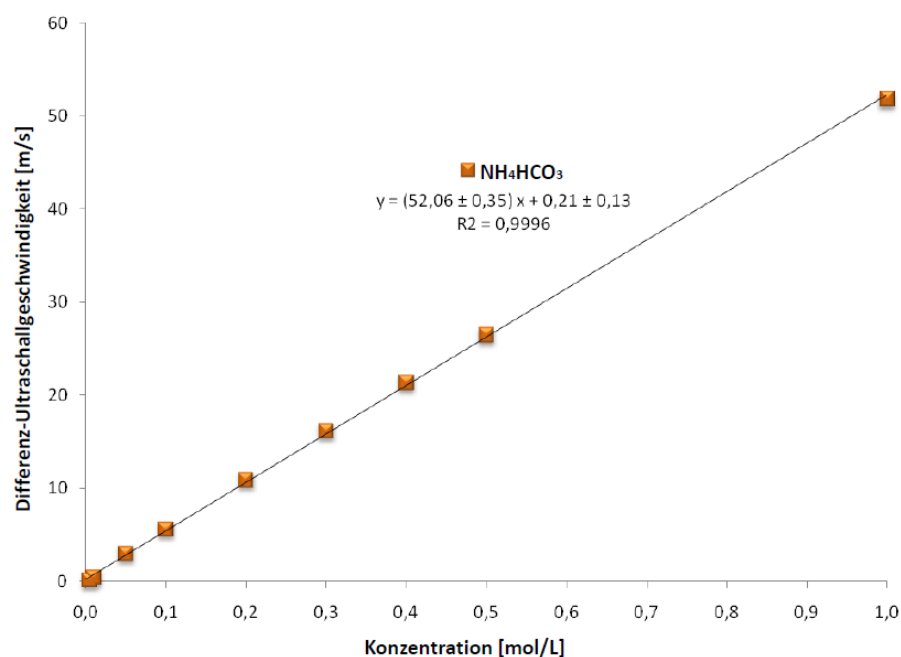


Abbildung 96: Ergebnis der Ammoniumhydrogencarbonat-Messung.

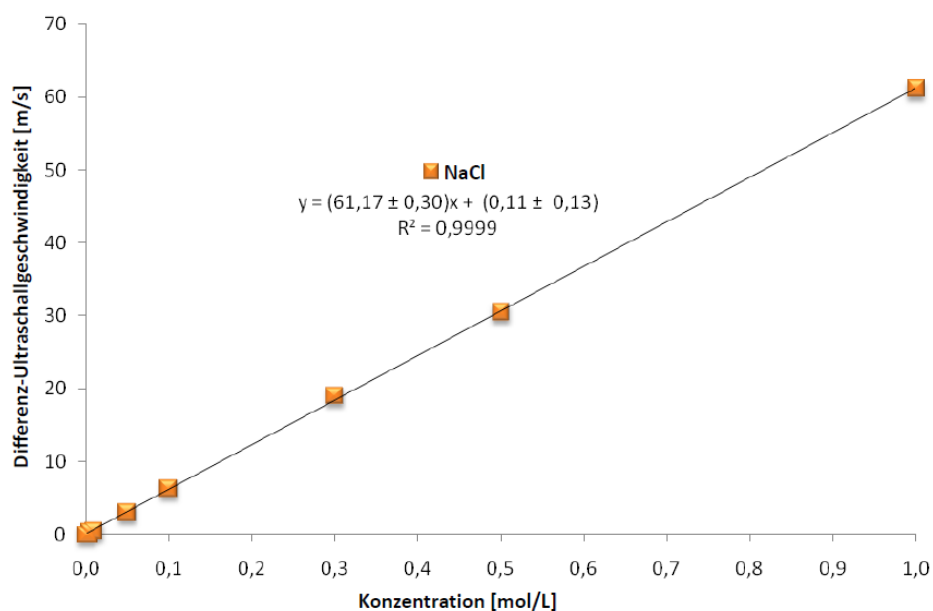


Abbildung 97: Bestimmung des Ultraschallgeschwindigkeit-Konzentration-Zusammenhangs für Natriumchlorid.

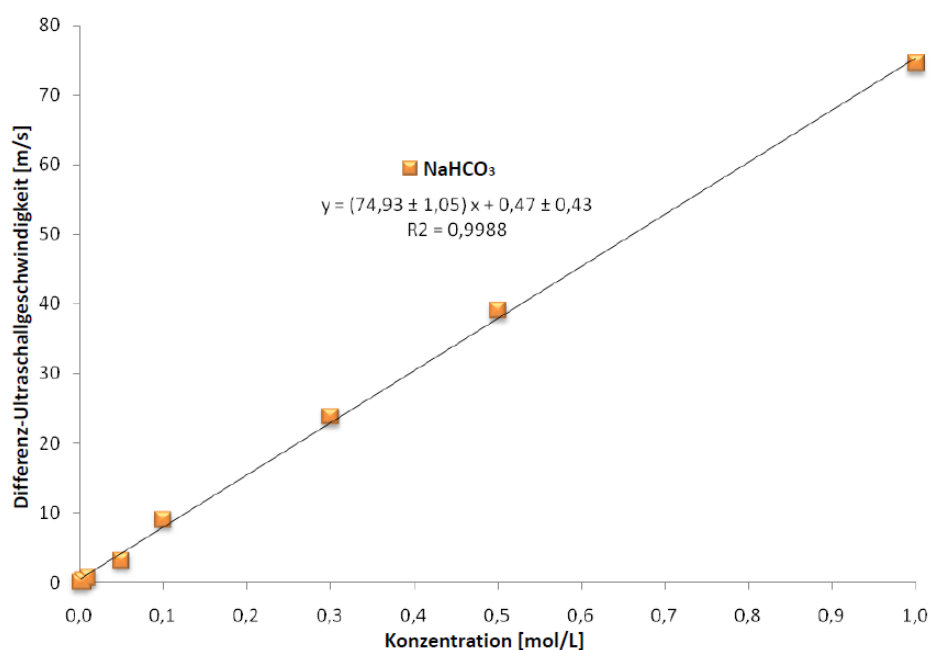


Abbildung 98: Kalibration für den Zusammenhang Ultraschallgeschwindigkeit-Konzentration für Natriumhydrogencarbonat.

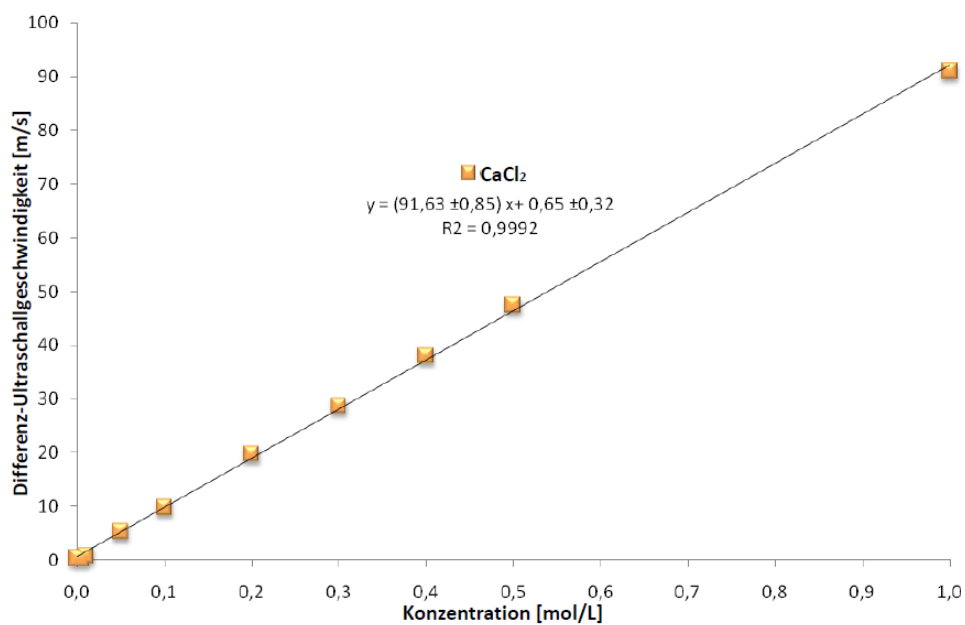


Abbildung 99: Messung der Differenz-Ultraschallgeschwindigkeit im Bereich von 0,005 mol/L bis 1,0 mol/L für Kalziumchlorid.

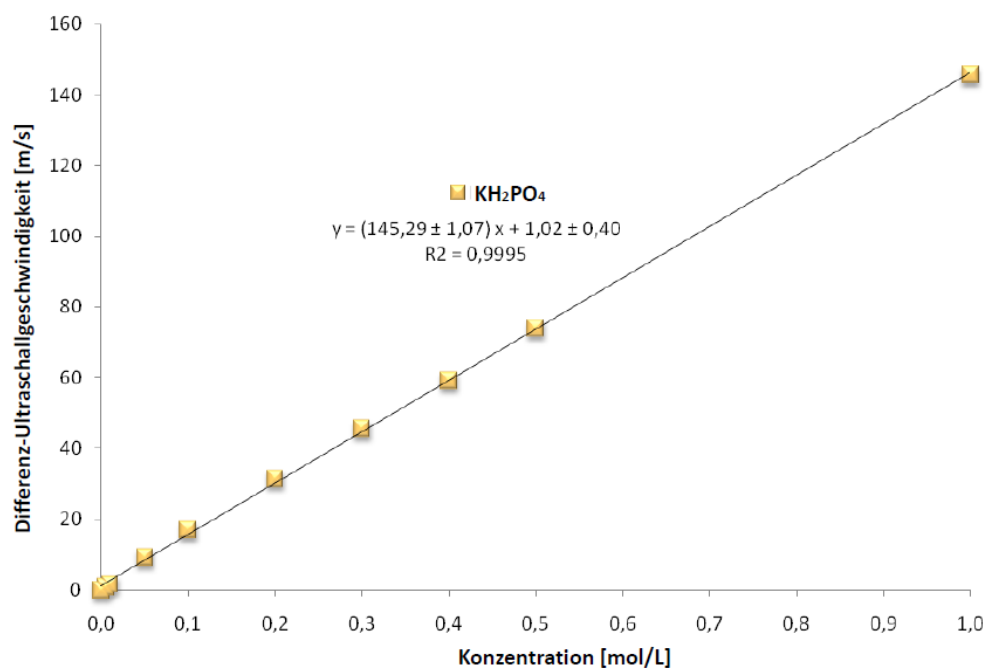


Abbildung 100: Bestimmung des linearen Zusammenhangs für den Konzentrationsbereich von 0-1 mol/L Kaliumdihydrogenphosphat.

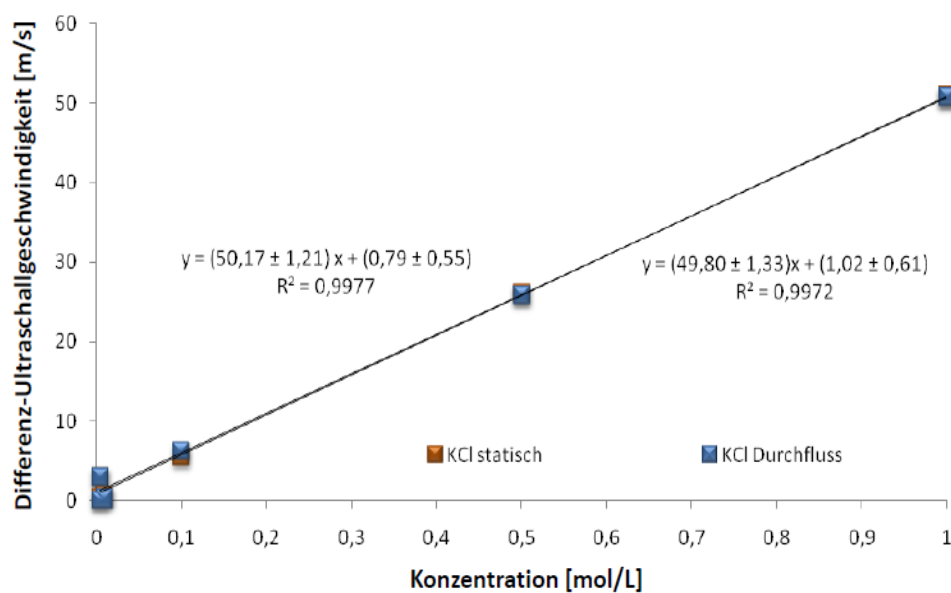


Abbildung 101: Vergleich der Messreihen von KCl im statischen und im Durchfluss-System gemessen.

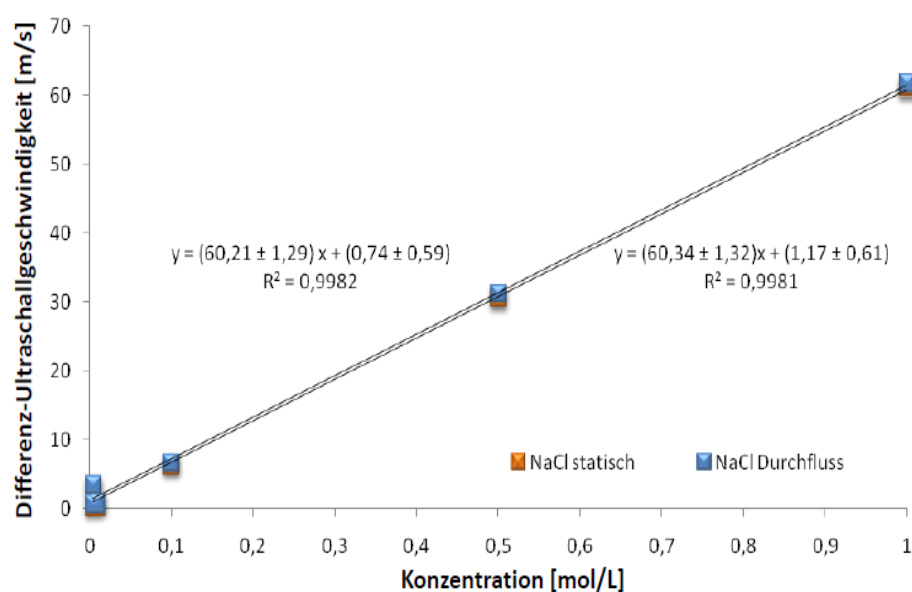


Abbildung 102: Messungen des statischen und des Durchfluss-Systems von NaCl-Proben.

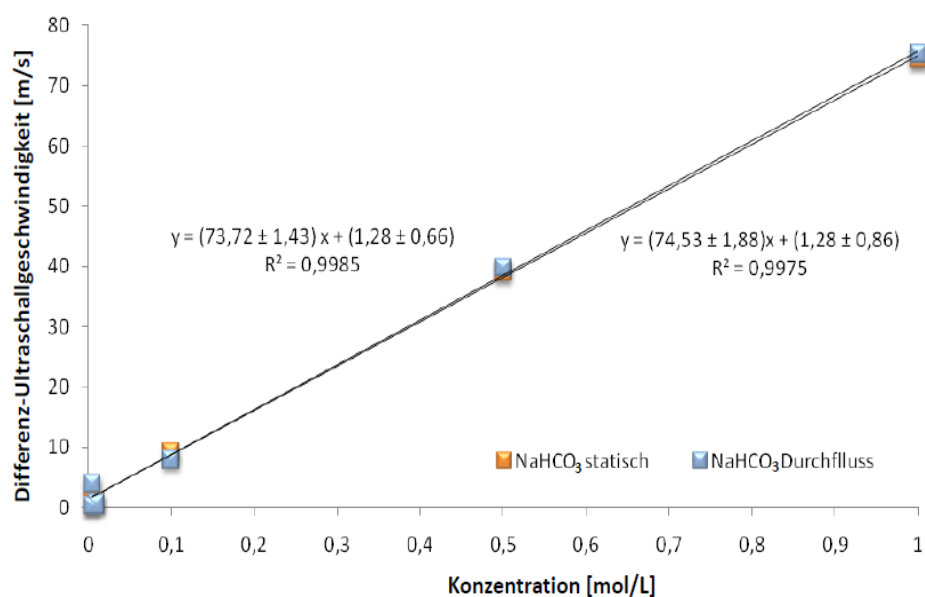


Abbildung 103: Messdaten der NaHCO₃-Proben vermessen im statischen im Vergleich zum Durchfluss-System.

6.4.2 Anhang Denaturierung von Proteinen

Zu den im Praktischen Teil präsentierten Denaturierungsbeispielen sind hier ergänzend Messdaten mit anderen Modellproteinen aufgeführt.

6.4.2.1 Harnstoffdenaturierung von Lysozym und Ovalbumin

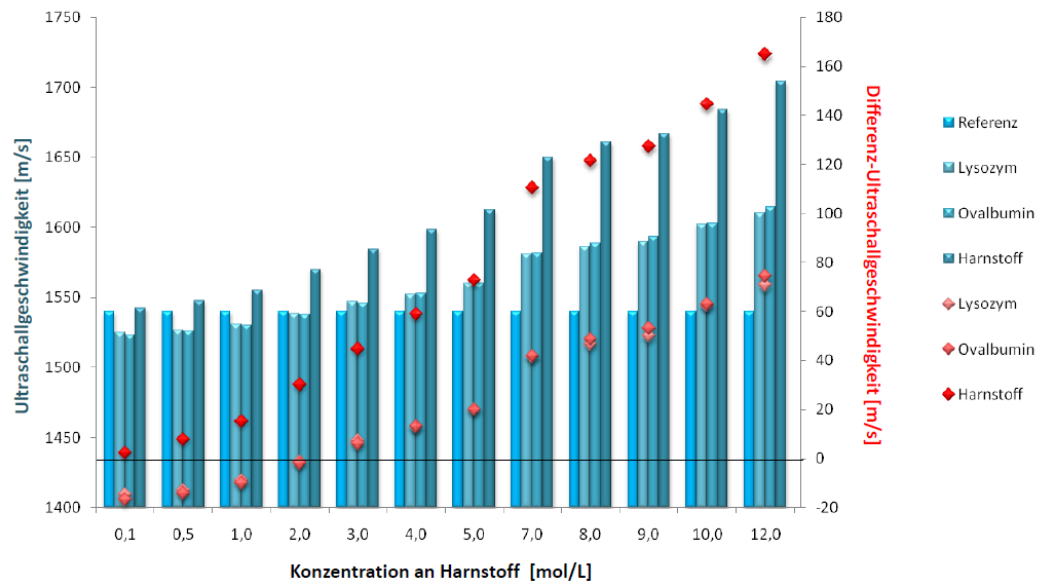


Abbildung 104: Messdaten der Harnstoff-Denaturierung von Lysozym und Ovalbumin im Vergleich zu den Messdaten der Harnstoffprobe. Gezeigt sind sowohl die Absolutwerte dargestellt durch blaue Balken und die Differenzwerte durch rote Rauten symbolisiert.

Auffällig an diesem Graphen sind die Werte der Proteinproben bis zu einer Konzentration von 2,0 mol/L Harnstoff-Konzentration. Sie liegen im negativen Differenzmessbereich und deuten damit auf eine Veränderung der Probe, respektive des Proteins hin.

6.4.2.2 Ergänzung der Temperaturdenaturierung von α -Chymotrypsin



Abbildung 105: Messung der Ultraschallgeschwindigkeit eines Temperaturverlaufs von 20 °C bis 80 °C mit α -Chymotrypsin in 4 % (m/m) NaCl-Lösung.

Der Beginn der Denaturierung ist im Differenzverlauf bei 50 °C abzulesen (Abbildung 100). Laut Literatur ist α -Chymotrypsin bis 50 °C¹⁹³ stabil.

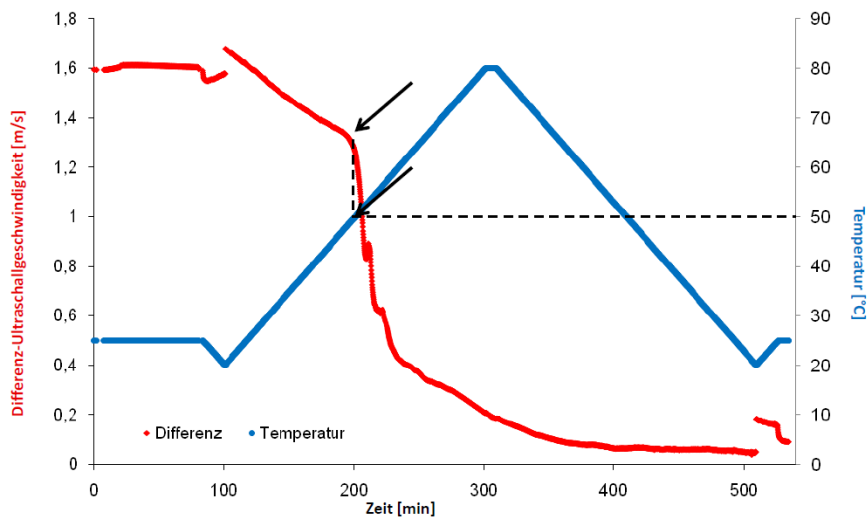


Abbildung 106: Darstellung des Differenz-Ultraschallgeschwindigkeits-Verlaufs einer α -Chymotrypsin Temperaturdenaturierung.

6.4.2.3 Denaturierung mittels Harnstoff

Verwendete Puffer:

50 mmol/L Citratpuffer pH 3

Für 1 L Puffer werden 5,75 ml Zitronensäure vorlegen. Diese werden mit desionisiertem Wasser auf 800 mL aufgefüllt. Der pH-Wert wird anschließend mit 1 mol/L Natronlauge auf pH 3 eingestellt. Die Lösung wird dann auf 1 L im Messzylinder aufgefüllt.

Lysozymlösung

0,9 g Lysozym werden in einem 2 ml-Eppendorfgefäß abgewogen. Und in 2 ml Citratpuffer gelöst. 220 µL dieser Lösung werden als Probe den Messungen zugefügt.

10 mol/L Harnstofflösung

60,06 g Harnstoff werden abgewogen und mit dem angesetzten Citratpuffer auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wird leicht erwärmt, um den Lösevorgang des Harnstoffs zu beschleunigen.

6.5 Anhang PDGF-BB

Die Untersuchungen der Strukturellen Eigenschaften des PDGF-BB wurden wie beschrieben an der TU Dortmund im Arbeitskreis von Prof. Winter von Frau Dr. Weise durchgeführt und zusammengefasst. Die folgenden Auswertungen sind ihrem BMBF-Jahresbericht vom Februar 2011 entnommen¹⁷³.

6.5.1 Strukturelle Analyse des PDGF-BB

Die Struktur des PDGF-BB wurde sowohl konzentrationsabhängig (im Bereich von 0,15 bis 0,30 mg/mL) als auch in Abhängigkeit einer Behandlung der Proben bei 60 °C für 30 min mit Hilfe der Zirkulardichroismusspektroskopie (CD-Spektroskopie von *engl. circular dichroism*) untersucht. Die CD-Spektren wurden mit einem Jasco J-715 Spektralphotometer (Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) im fernen UV-Bereich von 190-260 nm mit einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min in einer 0,1 mm dicken Quarzküvette (Hellma, Müllheim, Deutschland) aufgenommen. Als Messparameter wurden dabei eine Zeitkonstante von 2 s pro Scan, eine Auflösung von 1,0 nm, sowie eine Sensitivität von 100 mdeg/cm

verwendet. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur und mit einer Spaltbreite von 1,0 nm. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden von jedem Spektrum 10 Scans aufgenommen, so dass das dargestellte CD-Spektrum dem Mittelwert der akkumulierten Spektren entspricht. Die in der Einheit der Elliptizität θ (Milligrad) aufgenommenen Spektren wurden nach Subtraktion der Basislinie (PBS-Puffer mit pH 7,4 bestehend aus 9,1 mM K_2HPO_4 , 1,5 mM NaH_2PO_4 , 2,5 mM KCl, 125,5 mM NaCl und 0,9 wt% SDS) anschließend in die Einheit der Elliptizität der mittleren relativen Molekülmasse der Peptidmonomere θ_{MR} [$\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$] konvertiert und einer Fouriertransformation unterzogen. Aus den so bearbeiteten Spektren wurde dann der Sekundärstrukturgehalt mit Hilfe des CDNN-Programms unter Verwendung des Referenzsets NNET_33 für komplexe Spektren ermittelt, die einen signifikanten Anteil an Strukturinformationen aus Disulfidbrücken und aromatischen Seitenketten aufweisen¹⁹⁴.

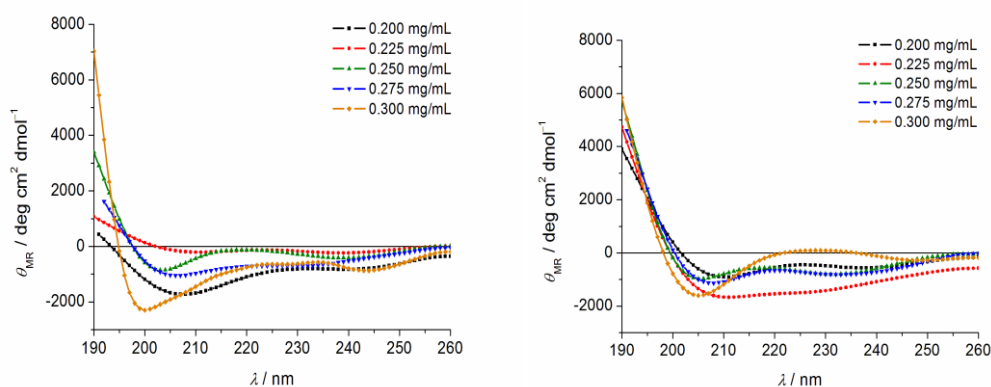


Abbildung 107: CD-Spektren von PDGF-BB in PBS-Puffer, pH 7,4 vor der Behandlung (links) und nach der Behandlung für 30 min bei 60°C (rechts) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Die Abbildung zeigt die Analysendaten für die erste Versuchsreihe von August 2010.

In Abbildung 107 sind die CD-Spektren der ersten Versuchsreihe (August 2010) dargestellt. Die dazugehörigen Sekundärstrukturanalysen sind in den Tabelle 25 und Tabelle 26 zusammengefasst. Die Daten zeigen für die Proben ohne Behandlung einen leichten Anstieg des Anteils an β -Faltblattstruktur mit zunehmender Proteinkonzentration. Auch die Behandlung der jeweiligen Proteinproben für 30 min bei 60°C führte bei allen untersuchten Konzentrationen zu einer geringfügigen Erhöhung des β -Faltblattgehaltes.

Tabelle 25: Sekundärstrukturanalyse der konzentrationsabhängigen CD-Messungen vor Behandlung der Proteinproben der ersten Versuchsreihe von August 2010. Die CD-Spektren des PDGF-BB wurden mittels des Analyseprogramms CDNN (Referenzset NNET_33) ausgewertet.

<i>C</i> [mg/mL]	α -Helix	β -Faltblatt	β -Schleifen	Zufallsknäuel
0,200	6,8 %	51,0 %	17,4 %	29,0 %
0,225	6,4 %	55,0 %	16,4 %	27,9 %
0,250	6,9 %	58,4 %	16,5 %	26,1 %
0,275	7,0 %	54,9 %	16,9 %	27,4 %
0,300	7,4 %	60,2 %	16,8 %	25,2 %

Tabelle 26: Sekundärstrukturanalyse der konzentrationsabhängigen CD-Messungen nach Behandlung der Proteinproben für 30 min bei 60°C der ersten Versuchsreihe von August 2010. Die CD-Spektren des PDGF-BB wurden mittels des Analyseprogramms CDNN (Referenzset NNET_33) ausgewertet.

<i>c</i> / mg mL ⁻¹	α -Helix	β -Faltblatt	β -Schleifen	Zufallsknäuel
0,200	7,4 %	59,9 %	16,1 %	25,3 %
0,225	8,2 %	58,2 %	16,5 %	25,6 %
0,250	7,9 %	61,7 %	16,3 %	24,4 %
0,275	7,9 %	61,2 %	16,2 %	24,6 %
0,300	7,1 %	62,3 %	16,4 %	24,7 %

Die CD-Spektren der PDGF-BB-Proben der zweiten Versuchsreihe (Januar 2011) sind in Abbildung 108 wiedergegeben. Die Tabelle 27 und In Abbildung 109 sind die wesentlichen Aussagen aus der Strukturanalyse des PDGF-BB mit Hilfe der CD-Spektroskopie noch einmal zusammengefasst. Der ermittelte Gehalt an β -Faltblattstruktur für die unbehandelten und gering konzentrierten Proben ($c < 0,25$ mg/mL) stimmt mit ca. 54,5% gut mit den aus der Literatur^{171, 172} bekannten Werten überein. Des Weiteren konnte für beide Versuchsreihen eine geringfügige Zunahme des β -Faltblattanteils durch Behandlung der PDGF-BB-Proben für 30 min bei 60°C nachgewiesen werden.

Tabelle 28 fassen die dazugehörigen Sekundärstrukturanalysen zusammen. Aus den Daten für die unbehandelten Proben lässt sich kein eindeutiger Trend für eine

Sekundärstrukturänderung mit zunehmender Proteinkonzentration ableiten. Im Rahmen der Messungenauigkeiten schwankt der Anteil an β -Faltblattstruktur um 56%. Trotz der Schwankungen lässt sich aber wie in der ersten Versuchsreihe ein leichter Anstieg des β -Faltblattgehaltes durch Behandlung der Proben für 30 min bei 60°C beobachten.

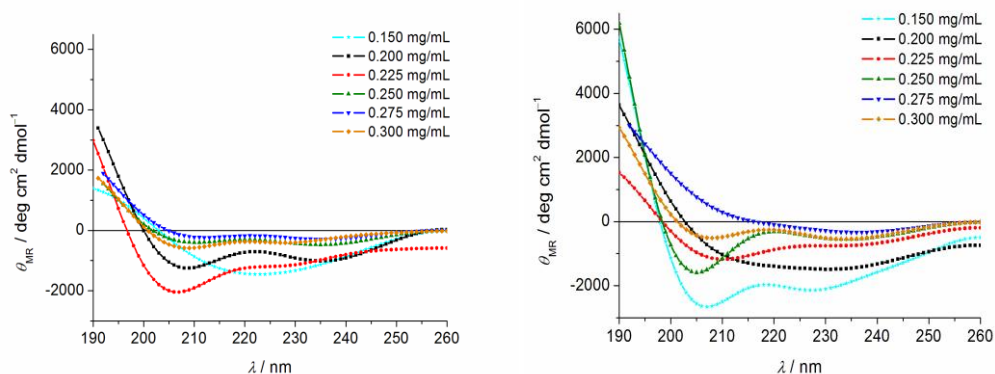


Abbildung 108: CD-Spektren von PDGF-BB in PBS-Puffer, pH 7,4 vor der Behandlung (links) und nach der Behandlung für 30 min bei 60°C (rechts) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Die Abbildung zeigt die Analysendaten für die zweite Versuchsreihe von Januar 2011.

Tabelle 27: Sekundärstrukturanalyse der konzentrationsabhängigen CD-Messungen vor Behandlung der Proteinproben der zweiten Versuchsreihe von Januar 2011. Die CD-Spektren des PDGF-BB wurden mittels des Analyseprogramms CDNN (Referenzset NNET_33) ausgewertet.

$c / \text{mg mL}^{-1}$	α -Helix	β -Faltblatt	β -Schleifen	Zufallsknäuel
0,150	7,2 %	53,3 %	16,5%	28,3%
0,200	7,6 %	58,8%	16,4%	25,5%
0,225	7,6%	54,4%	17,3%	27,1%
0,250	6,8%	56,5%	16,3%	27,1%
0,275	6,8%	57,6%	16,1%	26,7%
0,300	6,9%	55,8%	16,5%	27,3%

In Abbildung 109 sind die wesentlichen Aussagen aus der Strukturanalyse des PDGF-BB mit Hilfe der CD-Spektroskopie noch einmal zusammengefasst. Der ermittelte Gehalt an β -Faltblattstruktur für die unbehandelten und gering konzentrierten Proben ($c < 0,25$ mg/mL) stimmt mit ca. 54,5% gut mit den aus der Literatur^{171, 172} bekannten Werten überein. Des Weiteren konnte für beide Versuchsreihen eine geringfügige Zunahme des β -Faltblattanteils durch Behandlung der PDGF-BB-Proben für 30 min bei 60°C nachgewiesen werden.

Tabelle 28: Sekundärstrukturanalyse der konzentrationsabhängigen CD-Messungen nach Behandlung der Proteinproben für 30 min bei 60°C der zweiten Versuchsreihe von Januar 2011. Die CD-Spektren des PDGF-BB wurden mittels des Analyseprogramms CDNN (Referenzset NNET_33) ausgewertet.

$c / \text{mg mL}^{-1}$	α -Helix	β -Faltblatt	β -Schleifen	Zufallsknäuel
0,150	9,0%	57,4%	17,1%	25,1%
0,200	7,8%	58,4%	15,9%	25,7%
0,225	7,0%	54,1%	16,8%	27,8%
0,250	7,9%	62,4%	16,6%	24,0%
0,275	7,0%	61,2%	15,4%	25,4%
0,300	7,0%	58,5%	16,2%	26,1%

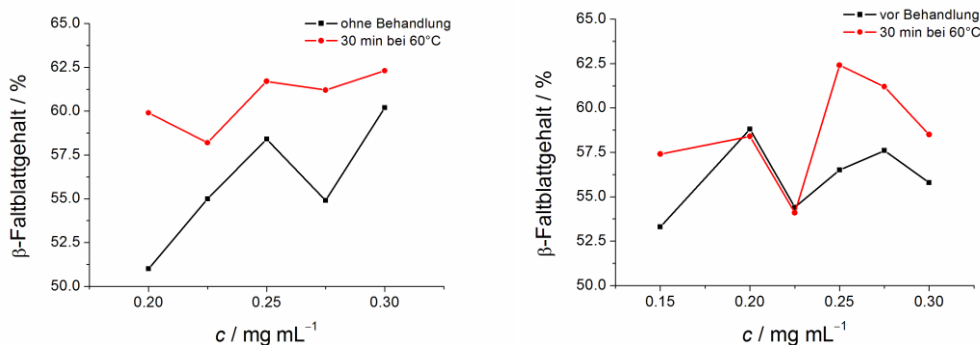


Abbildung 109: Sekundärstrukturanalyse des PDGF-BB in PBS-Puffer, pH 7,4 vor und nach der Behandlung für 30 min bei 60°C. Die Abbildung zeigt den Anteil an β -Faltblattstruktur in Abhängigkeit der Proteinkonzentration für die erste (August 2010, links) und zweite Versuchsreihe (Januar 2011, rechts).

Ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Anteils an β -Faltblattstruktur konnte aufgrund der Schwankungen in den Sekundärstrukturanalysen nicht eindeutig

belegt werden, was auf die starke Streuung der Proben bei Wellenlängen unterhalb von 200 nm zurückzuführen ist, die sowohl durch den hohen Anteil an Chloridionen als auch durch die Zugabe von SDS zum Probenpuffer verursacht wird.

6.5.2 Analyse der Morphologie des PDGF-BB

Im abschließenden Teil der vorliegenden Studie sollte eine mögliche Oligomerisierung der PDGF-BB-Proben in Abhängigkeit der Proteinkonzentration bzw. der Behandlung der Proben für 30 min bei 60°C mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (AFM von *engl. atomic force microscopy*) nachgewiesen werden. Für die AFM-Messungen wurden die PDGF-BB-Proben mit Wasser auf eine Konzentration von 1 µM verdünnt. Davon wurden 30 µL auf frisch gespaltene Glimmerscheibchen (SPI Supplies) gegeben und nach kurzer Inkubationszeit mit einem Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurde die Probe mit ca. 6 mL Wasser gewaschen, nochmals mit einem Stickstoffstrom getrocknet und anschließend über Nacht gefriergetrocknet. Die AFM-Messungen wurden mit einem MultiMode-Mikroskop der Firma Digital Instruments (Santa Barbara, CA, USA) durchgeführt, das mit einem NanoScope IIIa Controller und einem E-Scanner (Scanbereich 15 µm; Veeco Instruments, Mannheim, Germany) ausgestattet ist.

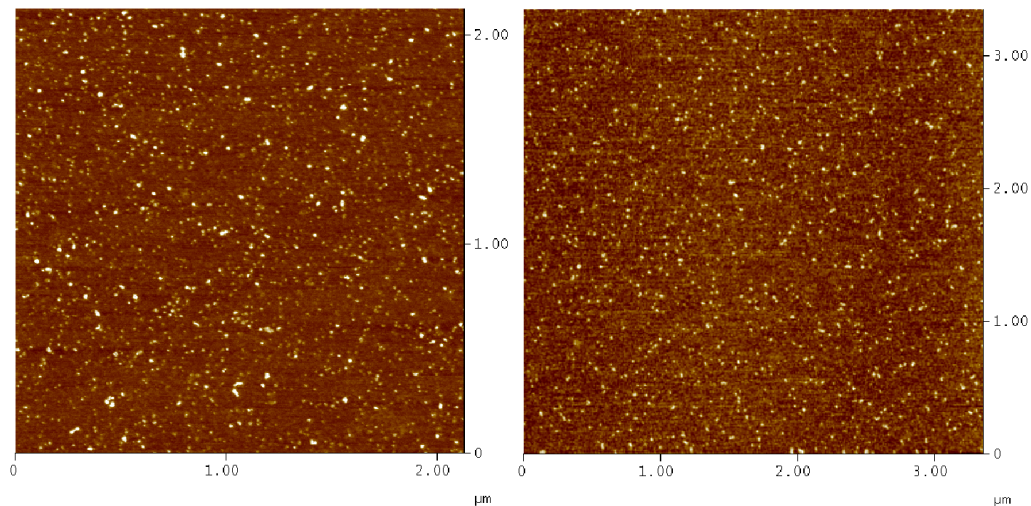


Abbildung 110: AFM-Bilder der PDGF-BB-Proben mit einer Konzentration von 0,150 mg/mL vor (links) und nach 30 min Behandlung bei 60°C (rechts). Die Höhenskala entspricht in beiden Aufnahmen 2,5 nm.

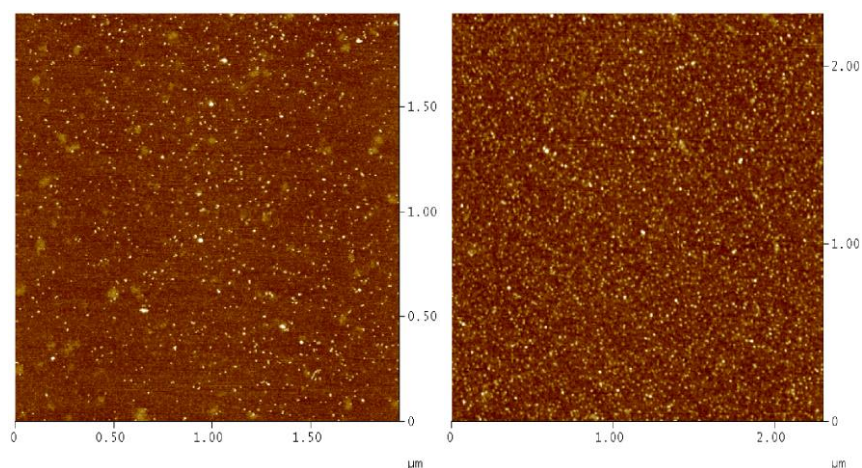


Abbildung 111: AFM-Bilder der PDGF-BB-Proben mit einer Konzentration von 0,250 mg/mL vor (links) und nach 30 min Behandlung bei 60°C (rechts). Die Höhenskala entspricht in beiden Aufnahmen 2,5 nm.

Die AFM-Aufnahmen erfolgten bei Raumtemperatur unter Verwendung des Tapping Modes in Luft mit Silizium-Rasterkraftsonden (SSS-NCH, Nanoworld, Wetzlar, Deutschland), die eine Kraftkonstante von 42 N/m und eine Resonanzfrequenz um 250 kHz aufweisen. Die Topographiebilder wurden mit einer Auflösung von 512×512 Pixeln und einer Scangeschwindigkeit von 1,0 Hz aufgenommen. Für die Bearbeitung und Analyse der AFM-Bilder wurde die Software NanoScope Version 5 verwendet.

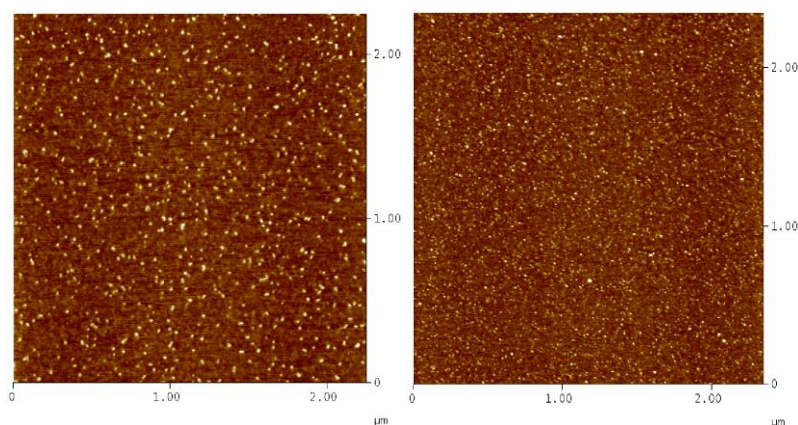


Abbildung 112: AFM-Bilder der PDGF-BB-Proben (01/2011) mit einer Konzentration von 0,300 mg/mL vor (links) und nach 30 min Behandlung bei 60°C (rechts). Die Höhenskala entspricht in beiden Aufnahmen 3,0 nm.

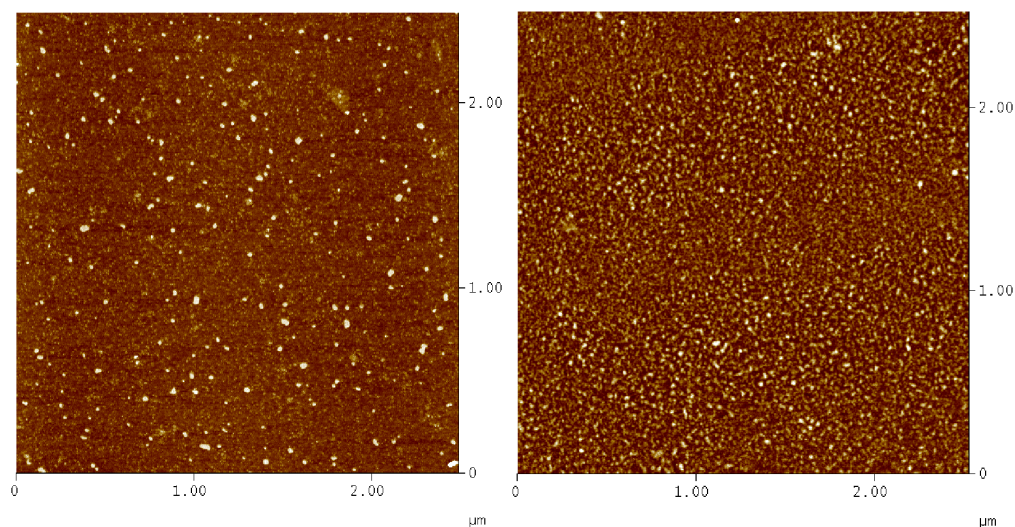


Abbildung 113: AFM-Bilder der PDGF-BB-Proben (08/2010) mit einer Konzentration von 0,300 mg/mL vor (links) und nach 30 min Behandlung bei 60°C (rechts). Die Höhenskala entspricht in beiden Aufnahmen 3,0 nm.

Die Abbildung 110 bis Abbildung 113 zeigen beispielhaft einige repräsentative AFM-Aufnahmen des PDGF-BB bei verschiedenen Konzentrationen vor und nach der Behandlung bei 60°C. Für jede Probe wurden mehrere voneinander unabhängige Probenbereiche gescannt. Die dazugehörigen Analysen der Partikelhöhe sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Bei Betrachtung des Konzentrationsbereiches von 0,200 mg/mL bis 0,300 mg/mL kann eine geringfügige Zunahme der Partikelgröße des unbehandelten PDGF-BB in den AFM-Bildern mit steigender Proteinkonzentration detektiert werden. Dem widerspricht allerdings der für eine Proteinkonzentration von 0,150 mg/mL ermittelte Messwert ($0,75 \pm 0,37$ nm), so dass die verzeichnete Änderung auch innerhalb des Messfehlers liegen könnte. Bei allen untersuchten Proteinkonzentrationen führt die Behandlung der Probe bei 60°C zu keiner detektierbaren signifikanten Änderung der Partikelgröße des PDGF-BB. Demzufolge lässt sich eine alterungsbedingte Oligomerisierung des PDGF-BB mittels AFM nicht nachweisen.

Tabelle 29: Zusammenfassung der Analysenwerte zur Partikelhöhe des PDGF-BB in den AFM-Bildern. Es sind die Mittelwerte mit der dazugehörigen Standardabweichung angegeben.

vor Behandlung	Ø Höhe PDGF-BB	nach Behandlung 30 min bei 60°C	Ø Höhe PDGF-BB
0,150 mg/mL	0,75 ± 0,37 nm	0,150 mg/mL	0,71 ± 0,36 nm
0,200 mg/mL	0,54 ± 0,25 nm		
0,250 mg/mL	0,60 ± 0,32 nm	0,250 mg/mL	0,62 ± 0,23 nm
0,300 mg/mL (01/2011)	0,80 ± 0,29 nm	0,300 mg/mL (01/2011)	0,73 ± 0,26 nm
0,300 mg/mL (08/2010)	0,73 ± 0,37 nm	0,300 mg/mL (08/2010)	0,80 ± 0,24 nm

Insgesamt waren die Daten nicht stichhaltig genug um die aufgestellte These einer konzentrationsabhängigen Oligomerisierung zu stützen.

6.5.3 Probenvorbereitung und verwendetet Lösungen

Die folgenden Punkte sind dem Kurzexperimenten-Protokoll „HPLC-Versuche bzgl. Verdünnung und Oligomerisierung“ vom 29.01. – 02.02.2010¹⁷⁴ entnommen:

- Verdünnung der Probe auf 250 µg/mL mit PBS
- Zugabe von 1/10 an SDS 10 %
- 5 Minuten bei 60 °C
- Abkühlen mind. 5 Min
- Auftragung von 50 µL auf Tosoh TSK G3000SWXL

Die Versuchsdurchführung wurde diesen Daten entsprechend an den Versuch angepasst. Die Protein-Proben wurden mit PBS-Puffer (siehe „Verwendeter PBS-Puffer“) aus den Vials aufgenommen.

Da das Gesamtvolumen der Probe 1 mL betragen sollte wurden jeweils 0,1 mL Puffer in ein Vial gegeben. Für die Konzentration von 200 µg/mL wurden von diesen 50 µg enthaltenden Vials vier verwendet. Für die 250 µg/mL Probe entsprechend fünf. Die vier so je in 0,1 mL gelösten 50 µg Protein (für die Darstellung der 200 µg/mL Probe) wurden mit den restlichen 0,6 mL Puffer aus den Vials in einen Eppi überführt. Für die 250 µg/mL Probe standen entsprechend noch 0,5 mL Puffer für das Überführen von fünf Vials zur Verfügung usw. Die

vorbereiteten Proben wurden anschließend weiterbehandelt, wie es Tabelle 1 zu entnehmen ist.

Verwendeter PBS-Puffer:

Für 500 mL PBS-Puffer wurden 4 g (64,8 mmol) Natriumchlorid eingewogen. 0,1 g (1,35 mmol) Kaliumchlorid, 0,103 g (0,75 mmol) Natriumdihydrogenphosphat und 0,871 g (5 mmol) Dikaliumhydrogenphosphat wurden hinzugefügt. Die Salzmischung wurde zunächst in 350 mL deionisiertem Wasser gelöst und anschließend mit 0,1 mol/L Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt. Abschließend wurde auf 500 mL mit deionisiertem Wasser aufgefüllt.

6.6 Herstellung der Stammlösungen und Verdünnungsreihen

Die eingesetzten Salzverdünnungsreihen wurden aus 100 mL einer 1 molaren Stammlösung angesetzt. Dazu wurde 1 mol des entsprechenden Salzes eingewogen und auf 100 mL mit deionisiertem Wasser aufgefüllt.

Bei den Proteinkalibrationen wurden 10 mL einer 1 g/L Stammlösung angesetzt.

Es wurden 2 mL Probe der Verdünnungsreihen für das statische Messgerät und 10-20 mL für die Durchflussmesszelle angesetzt.

Alle verwendeten Lösungen wurden hergestellt, indem zunächst der Solvent (Salze, Harnstoff, Ethanol, Protein, etc.) vorgelegt wurde und anschließend mit deionisiertem Wasser auf das gewünschte Volumen aufgefüllt wurde.

6.7 BTEE-Aktivitätstest

Die Abkürzung BTEE steht für den N-Benzoyl-L-Tyrosin-Ethylester. Im BTEE-Aktivitätstest wird dieser durch α -Chymotrypsin in der in Abbildung 114 gezeigten enzymatischen Hydrolyse umgesetzt. Er dient zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität des α -Chymotrypsin.

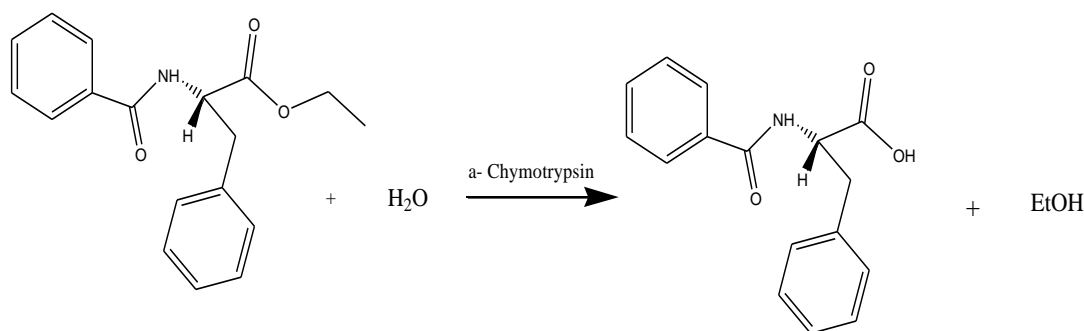


Abbildung 114: Hydrolyse von N-Benzoyl-L-Tyrosin-Ethylester durch α -Chymotrypsin¹⁹⁵.

Im Gegensatz zum Edukt absorbiert das gebildete N-Benzoyl-L-Tyrosin UV-Strahlung bei 256 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon = 964 \text{ L}/(\text{cm} \cdot \text{mol})$. Durch die Zunahme der Absorption lässt sich das Vorschreitende der Reaktion beobachten. Jede Messung ergibt eine für das Enzym typische AbsorptionsZeitKurve. Aus der Anfangssteigung wird nach Gleichung 14 die Enzymaktivität bestimmt.

$$\text{Aktivität} \left[\text{units (U)} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right] = \frac{v \cdot V_R}{\varepsilon \cdot d \cdot 10^{-6}} \quad (14)$$

Die Anfangssteigung v [1/min] wird aus den Daten erhalten. Das Reaktionsvolumen V_R (1 mL) und die Schichtdicke d (1 cm) sind wie der molare Extinktionskoeffizient ε (964 L/(cm·mol)) gegeben.

Mit den Enzymaktivitäten der einzelnen Proben kann die spezifische Enzymaktivität errechnet werden. In den durchgeführten Versuchen war allerdings nur von Interesse ob aktives oder inaktives Protein vorliegt.

Durchführung:

Die Proben wurden in einem Cary50 der Marke Varian, Deutschland, durchgeführt. 0,5 mL BTEE-Reagenz und 0,5 mL PBS-Puffer (pH 7,4; $c = 0,1 \text{ mol/L}$) werden in einer Quarzglasküvette zusammengegeben. Für 1 min wird bei $\lambda = 256 \text{ nm}$ mit dieser Lösung eine Grundlinie aufgenommen. Dann werden schnell 20 μL der entsprechenden Enzym-Probe der Lösung hinzugefügt. Die Messung wird fortgesetzt, bis die Steigung einen Wendepunkt erreicht oder die Messdauer 9 min überschreitet.

6.8 Bradford Proteinnachweis

Der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 ist in der Lage sowohl mit den unpolaren, hydrophoben Seitenketten von Proteinen, als auch mit den kationischen Gruppen in saurer Lösung Komplexe zu bilden. Der Komplex stabilisiert die blaue, unprotonierte, anionischen Sulfonatform des Farbstoffs. Diese Änderung kann photometrisch bestimmt werden, da sich das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm verschiebt. Der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes liegt so viel höher als der des freien Farbstoffes, dass die Zunahme der Absorption bei 595 nm mit hoher Empfindlichkeit gegen die Absorption der unkomplexierten Farbreaktion photometrisch ermittelt werden kann. Die Absorption ist dabei proportional zur Proteinkonzentration. Der Bradford-Test stellt also lediglich eine quantitative Bestimmungsmethode für Proteine dar. Es wird keine Aussage über ihre Aktivität getroffen.

Es werden standardmäßig Proteinkonzentrationen im Bereich von 100-1500 µg/mL bestimmt. Die Komplexbildung ist vom zu untersuchenden Protein abhängig. Daher sollte es in Reinform zur Erstellung einer Kalibration verwendet werden. Ist dies nicht möglich wird ein Referenz-Protein wie z.B. BSA, zur Kalibration zurückgegriffen.

6.9 Verwendete Chemikalien

Substanzname	Summenformel	Herstellername
Ammoniumhydrogencarbonat	NH_4HCO_3	Merck
Dikaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	Fluka
Ethanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Fluka
Harnstoff	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	Merck
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Merck
Kaliumsulfat	K_2SO_4	Merck
Kalziumchlorid	CaCl_2	Merck
Lysozym	-	Sigma
Natriumbromid	NaBr	Merck
Natriumcarbonat	Na_2CO_3	Merck
Natriumchlorid	NaCl	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat	NaH_2PO_4	Merck
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO_3	Merck
Natriumiodid	NaI	Merck
Natronlauge	$\text{NaOH}_{(\text{aq})}$	Fluka
RNase A	-	Sigma
Salzsäure	HCl	Fluka
TEG	-	Merck
Zitronensäure	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	Fluka
α -Chymotrypsin	-	Sigma

6.10 DSA 5000 Dichte- und Schallgeschwindigkeitsmessgerät



Abbildung 115: Foto des DAS 5000 der Firma Anton Paar® GmbH ¹⁹⁶.

Der DSA 5000 stammt vom Hersteller Anton Paar® GmbH. Er ist in der Lage parallel die Dichte, über das Biegeschwingerprinzip, und die Schallgeschwindigkeit einer Probe zu bestimmen. Das System findet u. a. Anwendung im Bereich der Qualitätskontrolle von Produktionsprozessen und der Konzentrationsbestimmung ternärer Lösungen. Wie in Abbildung 116 gezeigt ist die Schallgeschwindigkeitsmessung und die Dichtemessung direkt nacheinander geschaltet. Das Volumen der Messzelle beträgt dabei 3 ml. In ein bis vier Minuten Messzeit kann das Gerät Dichten von 0 - 3 g/cm³ und Schallgeschwindigkeiten von 1000 - 2000 m/s messen. Die Genauigkeit ist dabei von der Anwendung abhängig, beträgt aber typischerweise 0,01 - 0,1 % ¹⁹⁶.

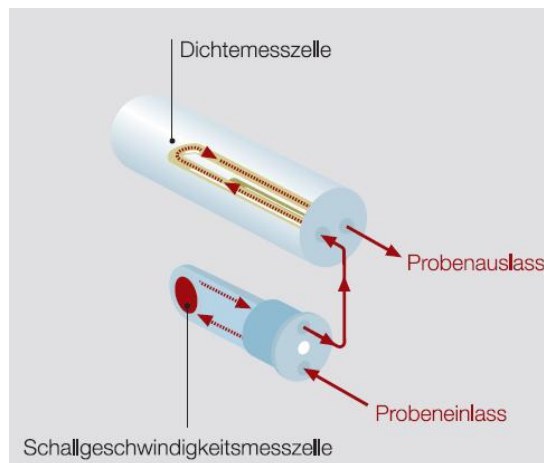


Abbildung 116: Schematischer Aufbau der Anton Paar® Dichte- und Schallgeschwindigkeitsmessgeräts ¹⁹⁶.

7 Literaturverzeichnis

1. Kratochwil, A. 1967. Kritische Betrachtung Zur Ein- Und Zweidimensionalen Darstellung Der Ultraschall-Untersuchungsergebnisse in Geburtshilfe Und Gynakologie. *Gynaecologia* 164:37-&.
2. Benes, E. 2010. Ultraschall in der Natur, Technik und Medizin. In UMP 2010.
3. WWF, f. a. l. p. 2011. <http://www.wwf.de/themen/artenschutz/bedrohtetiere-und-pflanzen/wie-wale-kommunizieren/>.
4. Bicz, W. 2011. <http://www.optel.pl/article/deutsch/ultradzwieki.htm>.
5. Grimm, M. u. D.-I. H. 2006. http://www.wissenschaft-technik-ethik.de/wasser_eigenschaften.html#kap11.
6. Kuttruff, H. 2004. Akustik. Hirzel, Stuttgart.
7. William J. Thieman, and M. A. Palladino. 2007. Biotechnologie. Pearson Studium, München.
8. Winter, R., S. Grudzielanek, and V. Smirnovas. 2007. The effects of various membrane physical-chemical properties on the aggregation kinetics of insulin. *Chemistry and Physics of Lipids* 149:28-39.
9. Winter, R., J. Kraineva, and V. Smirnovas. 2007. Effects of lipid confinement on insulin stability and amyloid formation. *Langmuir* 23:7118-7126.
10. Smirnovas, V., R. Winter, T. Funck, and W. Dzwolak. 2006. Protein amyloidogenesis in the context of volume fluctuations: A case study on insulin. *Chemphyschem* 7:1046-1049.
11. Winter, R., S. Grudzielanek, and V. Smirnovas. 2006. Solvation-assisted pressure tuning of insulin fibrillation: From novel aggregation pathways to biotechnological applications. *Journal of Molecular Biology* 356:497-509.
12. Smirnovas, V., and R. Winter. 2008. Revealing different aggregation pathways of amyloidogenic proteins by ultrasound velocimetry. *Biophysical Journal* 94:3241-3246.
13. Capelo-Martínez, J.-L. 2009. Ultrasound in Chemistry. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
14. Hao Feng, G. V. B.-C., Jochen Weiss. 2011. Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing. Springer Science+Business Media New York, Dordrecht, Heidelberg, London.
15. O'Brien, W. D. 2007. Ultrasound-biophysics mechanisms. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 93:212-255.
16. Kuttruff, H. 1988. Physik und Technik des Ultraschalls. Hirzel, Stuttgart.
17. eltrotec. 2011. Ultraschall - Einsatzgebiete http://www.eltrotec.com/db/pdf/Ultraschall_Anwendungen.pdf.
18. Schaaffs, W. 1967. Landolt-Börnstein: Zahlenwerte und Funktionen aus Naturwissenschaften und Technik. Springer-Verlag, Berlin.
19. Merton, D. A. 1997. Diagnostic Medical Ultrasound Technology: A Brief Historical Review. *Journal of Diagnostic Medical Sonography* 13:10S-23S.

20. Mason, T. J., and J. P. Lorimer. 1989. An Introduction to Sonochemistry. *Endeavour* 13:123-128.
21. Leighton, T. G. 1994. The acoustic bubble, San Diego, CA.
22. Yasui, K. 2002. Influence of ultrasonic frequency on multibubble sonoluminescence. *Journal of the Acoustical Society of America* 112:1405-1413.
23. Mason, T. J. 2007. Developments in ultrasound - Non-medical. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 93:166-175.
24. Margulis, M. A. 1992. Fundamental-Aspects of Sonochemistry. *Ultrasonics* 30:152-155.
25. Mason, T. J. 1992. Industrial Sonochemistry - Potential and Practicality. *Ultrasonics* 30:192-196.
26. Sullivan, C. 1992. Sonochemistry - a Sound Investment. *Chemistry & Industry*:365-365.
27. Suslick, K. S. 2000. Sonochemistry: A physical perspective. *Nonlinear Acoustics at the Turn of the Millennium* 524:95-104, 569.
28. Riley, N. 2001. Steady streaming. *Annual Review of Fluid Mechanics* 33:43-65.
29. Suslick, K. E. 1988. *Ultrasound*. VCH, Weinheim.
30. Hauptmann, P., N. Hoppe, and A. Puttmer. 2002. Application of ultrasonic sensors in the process industry. *Measurement Science & Technology* 13:R73-R83.
31. Langevin, P. 1917. Patentnummer 505,703.
32. Bleifeld, W., and S. Effert. 1964. Nachweis Von Echinokokkuszysten Der Leber Mit Dem Ultraschall-Echoverfahren. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 89:2418-&.
33. Effert, S., H. Erkens, and F. Grossebrockhoff. 1957. Über Die Anwendung Des Ultraschall-Echoverfahrens in Der Herzdiagnostik. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 82:1253-1257.
34. Devcic-Kuhar, B., S. Pfaffenberger, M. Groschl, C. Kollmann, E. Benes, and M. Gottsauner-Wolf. 2002. In vitro thrombolysis enhanced by standing and travelling ultrasound wave fields. *Ultrasound in Medicine and Biology* 28:1181-1187.
35. Reydon, B. N. 1965. Ultraschall-Therapie Bei Morbus Meniere. *Practica Oto-Rhino-Laryngologica* 27:140-&.
36. Kuttig, H. 1965. Ultraschall in Der Medizin. *Strahlentherapie* 128:634-&.
37. Hunzinger, W., H. Sullmann, and G. Viollier. 1950. Über Die Wirkung Von Ultraschall Auf Gerinnungskomponenten Des Blutplasmas. *Helvetica Chimica Acta* 33:198-207.
38. Hunzinger, W., H. Sullmann, and G. Viollier. 1950. Einwirkung Von Ultraschall Auf Das Gerinnungssystem Des Blutplasmas. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 80:1366-1366.
39. Bugyi, B. 1966. Untersuchung Der Muskulatur Mit Ultraschall-Echolot-Verfahren. *Annales Paediatrici* 206:235-&.

40. Krnic, A. 2007. "Computer analysis of liver texture with correlation to biopsy" - *Ultraschall in Med* 2005; 26 : 197-202. *Ultraschall in Der Medizin* 28:85-85.
41. Gaitini, D., and H. Azhari. 2007. "Computer analysis of liver texture with correlation to biopsy" - *Ultraschall in Med* 2005; 26 : 197-202 - Response. *Ultraschall in Der Medizin* 28:85-86.
42. Krautkramer, J., and W. Roth. 1953. *Werkstoffprüfung Mit Ultraschall in Der Leichtmetall-Halbzeugindustrie. *Zeitschrift Fur Metallkunde* 44:198-205.
43. Lutsch, A. 1953. Zerstorungsfreie Werkstoffprüfung Von Isolatoren Mit Ultraschall. *Angewandte Chemie* 65:141-141.
44. Kerkhof, F. 1953. Analyse Des Sproden Zugbruches Von Glasern Mittels Ultraschall. *Naturwissenschaften* 40:478-478.
45. Krautkramer, J. 1954. *Fortschritte Der Werkstoffprüfung Mit Ultraschall. *Zeitschrift Fur Metallkunde* 45:154-157.
46. Krautkramer, J. 1957. Das Ultraschall-Strahlungsfeld Und Seine Bedeutung Fur Die Werkstoffprüfung in Tauchtechnik. *Zeitschrift Fur Metallkunde* 48:606-609.
47. Meyer, H. J. 1965. Beispiele Fur Die Einsatzmoglichkeit Der Ultraschall-Schwachungsmessung Zur Bestimmung Von Werkstoff- Und Festigkeitseigenschaften an Bauteilen. *Metall* 19:435-&.
48. Lehfeldt, W. 1965. Automatische Prüfung Von Blechen Bandern Staben Und Rohren Mit Hilfe Von Ultraschall. *Zeitschrift Fur Metallkunde* 56:569-&.
49. Trommler, H. 1965. Ein Ultraschall-Materialprüfgerät Mit Zwei Darstellungsarten. *Zeitschrift Fur Instrumentenkunde* 73:186-&.
50. Kerkhof, F. 1953. Untersuchung Des Bruchvorganges Sproder Korper Mit Ultraschall. *Angewandte Chemie* 65:85-85.
51. [Anon]. 1967. Krautkramer,J - Werkstoffprüfung Mit Ultraschall. *Metall* 21:998-&.
52. [Anon]. 1967. Leck- Und Schadensfeststellung Durch Ultraschall. *Chemiker-Zeitung* 91:211-&.
53. Lee, H. 1996. Scanning tomographic acoustic microscopy: A historical overview. *Acoustical Imaging*, Vol 22 22:645-650, 832.
54. Semmens, J. E., and L. W. Kessler. 1990. Nondestructive Evaluation of Tab Bonding by Means of Acoustic Microscopy - Overview of Progress Using C-Mode Scanning Acoustic Microscopy. Ninth Ieee/Chmt International Electronics Manufacturing Technology Symposium : Competitive Manufacturing for the Next Decade:92-97, 370.
55. Bischoff, O., X. W. Wang, N. Heidmann, R. Laur, and S. Paul. 2010. Implementation of an Ultrasonic Distance Measuring System with Kalman Filtering in Wireless Sensor Networks for Transport Logistics. *Eurosensor Xxiv Conference* 5:196-199, 1501.
56. Park, J., Y. Je, H. Lee, and W. Moon. 2010. Design of an ultrasonic sensor for measuring distance and detecting obstacles. *Ultrasonics* 50:340-346.

57. Carullo, A., F. Ferraris, S. Graziani, U. Grimaldi, and M. Parvis. 1996. Ultrasonic distance sensor improvement using a two-level neural network. *Ieee Transactions on Instrumentation and Measurement* 45:677-682.
58. Henning, B., P. C. Daur, S. Prange, K. Dierks, and P. Hauptmann. 2000. In-line concentration measurement in complex liquids using ultrasonic sensors. *Ultrasonics* 38:799-803.
59. Gätke, J. 1991. *Akustische Strömungs- und Durchflussmessung*. Akademie-Verlag, Berlin.
60. Mulet, A., J. Benedito, J. Bon, and N. Sanjuan. 1999. Low intensity ultrasonics in food technology. *Food Science and Technology International* 5:285-297.
61. Hauptmann, P. 1987. Process Monitoring of Fluid Systems Based on Ultrasonic Sensors. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology* 2:49-57.
62. Ouriev, B., E. Windhab, P. Braun, and B. Birkhofer. 2004. Industrial application of ultrasound based in-line rheometry: From stationary to pulsating pipe flow of chocolate suspension in precrystallization process. *Review of Scientific Instruments* 75:3164-3168.
63. Ouriev, B., E. Windhab, P. Braun, Y. Zeng, and B. Birkhofer. 2003. Industrial application of ultrasound based in-line rheometry: Visualization of steady shear pipe flow of chocolate suspension in pre-crystallization process. *Review of Scientific Instruments* 74:5255-5259.
64. Becker, T., B. Hitzmann, K. Muffler, R. Portner, K. F. Reardon, F. Stahl, and R. Ulber. 2007. Future aspects of bioprocess monitoring. *White Biotechnology* 105:249-293.
65. Becker, T., M. Mitzscherling, and A. Delgado. 2001. Ultrasonic velocity - A noninvasive method for the determination of density during beer fermentation. *Chemical Engineering & Technology* 24:61a-67a.
66. Becker, T., M. Mitzscherling, and A. Delgado. 2002. Hybrid data model for the improvement of an ultrasonic-based gravity measurement system. *Food Control* 13:223-233.
67. B. Henning, J. R. 2006. Process monitoring using ultrasonic sensor systems. *Ultrasonics* 44:E1395-E1399.
68. Dickinson, E., M. I. Goller, D. J. McClements, S. Peasgood, and M. J. W. Povey. 1990. Ultrasonic Monitoring of Crystallization in an Oil-in-Water Emulsion. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions* 86:1147-1148.
69. Dickinson, E., M. I. Goller, D. J. McClements, and M. J. W. Povey. 1991. Monitoring Crystallization in Simple and Mixed Oil-in-Water Emulsions Using Ultrasonic Velocity-Measurement. *Food Polymers, Gels, and Colloids* 82:171-179, 575.
70. Hauptmann, P., R. Lucklum, A. Puttmer, and B. Henning. 1998. Ultrasonic sensors for process monitoring and chemical analysis: state-of-the-art and trends. *Sensors and Actuators a-Physical* 67:32-48.

71. McClements, D. J., M. J. W. Povey, and E. Dickinson. 1991. Ultrasonic Monitoring of Melting/Crystallization in Emulsions. *Ultrasonics International* 91:107-110, 677.
72. Pasupuleti, G., D. D. Hongerholt, J. L. Rose, and R. M. German. 1996. Ultrasonic sensors for process monitoring in powder injection molding. *Trends in Nde Science and Technology - Proceedings of the 14th World Conference on Ndt (14th Wcndt)*, Vols 1-5:545-548, 2684.
73. Sheen, S. H., H. T. Chien, and A. C. Raptis. 1997. Ultrasonic sensors for on-line monitoring of viscosity and solid concentration in a waste transport line. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 214:128-IEC.
74. Glindkamp, A., D. Riechers, C. Rehbock, B. Hitzmann, T. Scheper, and K. F. Reardon. 2009. Sensors in Disposable Bioreactors Status and Trends. *Disposable Bioreactors* 115:145-169.
75. Brown, L. F., and J. L. Mason. 1996. Disposable PVDF ultrasonic transducers for nondestructive testing applications. *Ieee Transactions on Ultrasonics Ferroelectrics and Frequency Control* 43:560-568.
76. Resa, P., T. Bolumar, L. Elvira, G. Perez, and F. M. de Espinosa. 2007. Monitoring of lactic acid fermentation in culture broth using ultrasonic velocity. *Journal of Food Engineering* 78:1083-1091.
77. Masuzawa, N., A. Kimura, and E. Ohdaira. 2003. Ultrasonic monitoring of the progress of lactic acid fermentation. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1-Regular Papers Short Notes & Review Papers* 42:2963-2964.
78. Elmehdi, H. M., J. H. Page, and M. G. Scanlon. 2003. Monitoring dough fermentation using acoustic waves. *Food and Bioproducts Processing* 81:217-223.
79. Thomas Schöck, M. H., Thomas Becker. 2010. Konzentrationsbestimmung in Wasser-Zucker-Ethanol-Gemischen mittels adiabatischer Kompressibilität und Dichte. *tm - Technisches Messen* 77:30-37.
80. T. Schöck, T. B. 2010. Sensor array for the combined analysis of water-sugar-ethanol mixtures in yeast fermentation by ultrasound. *Food Control* 21:362-369.
81. Resa, P., L. Elvira, and F. M. de Espinosa. 2004. Concentration control in alcoholic fermentation processes from ultrasonic velocity measurements. *Food Research International* 37:587-594.
82. Kayser, O. 2002. *Grundwissen Pharmazeutische Biotechnologie*. B.G.Teubner, Stuttgart/Leipzig/Wiesbaden.
83. Rokhina, E. V., P. Lens, and J. Virkutyte. 2009. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. *Trends in Biotechnology* 27:298-306.
84. Santos, H. M., and J. L. Capelo. 2007. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta* 73:795-802.
85. Sotomayor, M., and K. Schulten. 2007. Single-molecule experiments in vitro and in silico. *Science* 316:1144-1148.
86. Manas, P., B. Munoz, D. Sanz, and S. Condon. 2006. Inactivation of lysozyme by ultrasonic waves under pressure at different temperatures. *Enzyme and Microbial Technology* 39:1177-1182.

87. Dietrich, F. M. 1962. Inactivation of Egg-White Lysozyme by Ultrasonic Waves and Protective Effect of Amino-Acids. *Nature* 195:146-&.
88. Geyer, H. 1963. Die Wirkung Von Ultraschall Auf Tryptophanase Aus *Escherichia Coli*. *Archiv Fur Mikrobiologie* 46:9-&.
89. Hoshino, Y., T. Kawasaki, and Y. Okahata. 2006. Effect of ultrasound on DNA polymerase reactions: Monitoring on a 27-MHz quartz crystal microbalance. *Biomacromolecules* 7:682-685.
90. De Gennaro, L., S. Cavella, R. Romano, and P. Masi. 1999. The use of ultrasound in food technology I: inactivation of peroxidase by thermosonication. *Journal of Food Engineering* 39:401-407.
91. Martin, D., and E. Schlimme. 2002. Influence of technological measures on the activity behaviour of the milk enzyme adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4). *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 54:305-315.
92. Sanchez-Gimeno, A. C., A. Vercet, and P. Lopez-Buesa. 2006. Studies of ovalbumin gelation in the presence of carrageenans and after manothermosonication treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 7:270-274.
93. Vercet, A., R. Oria, P. Marquina, S. Crelier, and P. Lopez-Buesa. 2002. Rheological properties of yoghurt made with milk submitted to manothermosonication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:6165-6171.
94. Vercet, A., J. Burgos, and P. Lopez-Buesa. 2002. Manothermosonication of heat-resistant lipase and protease from *Pseudomonas fluorescens*: effect of pH and sonication parameters. *Journal of Dairy Research* 69:243-254.
95. Vercet, A., C. Sanchez, J. Burgos, L. Montanes, and P. L. Buesa. 2002. The effects of manothermosonication on tomato pectic enzymes and tomato paste rheological properties. *Journal of Food Engineering* 53:273-278.
96. Vercet, A., and P. L. Buesa. 2002. The effects of manothermosonication on tomato endopolygalacturonase beta-subunit. *European Food Research and Technology* 214:310-312.
97. Vercet, A., J. Burgos, and P. Lopez-Buesa. 2001. Manothermosonication of foods and food-resembling systems: Effect on nutrient content and nonenzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:483-489.
98. Vercet, A., P. Lopez, and J. Burgos. 1999. Inactivation of heat-resistant pectinmethylesterase from orange by manothermosonication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:432-437.
99. Lopez, P., A. Vercet, A. C. Sanchez, and J. Burgos. 1998. Inactivation of tomato pectic enzymes by manothermosonication. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology* 207:249-252.
100. Vercet, A., P. Lopez, and J. Burgos. 1998. Free radical production by manothermosonication. *Ultrasonics* 36:615-618.

101. Vercet, A., P. Lopez, and J. Burgos. 1997. Inactivation of heat-resistant lipase and protease from *Pseudomonas fluorescens* by manothermosonication. *Journal of Dairy Science* 80:29-36.
102. Miller, D. L., and R. M. Thomas. 1994. Cavitation Dosimetry - Estimates for Single Bubbles in a Rotating-Tube Exposure System. *Ultrasound in Medicine and Biology* 20:187-193.
103. Sener, N., D. K. Apar, and B. Ozbek. 2006. A modelling study on milk lactose hydrolysis and beta-galactosidase stability under sonication. *Process Biochemistry* 41:1493-1500.
104. Sener, N., D. K. Apar, and B. Ozbek. 2005. A modelling study on enzymatic hydrolysis of milk lactose by a sonifier. *Journal of Biotechnology* 118:S118-S118.
105. Tiwari, H. C., P. Singh, P. K. Mishra, and P. Srivastava. 2010. Evaluation of various techniques for extraction of natural colorants from pomegranate rind - Ultrasound and enzyme assisted extraction. *Indian Journal of Fibre & Textile Research* 35:272-276.
106. Sharma, P., and P. Nahar. 2009. Ultrasound wave-mediated enzyme-linked immunosorbent assay technique. *Analytica Chimica Acta* 650:241-246.
107. Sangave, P. C., and A. B. Pandit. 2006. Ultrasound and enzyme assisted biodegradation of distillery wastewater. *Journal of Environmental Management* 80:36-46.
108. Entezari, M. H., and C. Petrier. 2005. A combination of ultrasound and oxidative enzyme: sono-enzyme degradation of phenols in a mixture. *Ultrasonics Sonochemistry* 12:283-288.
109. Entezari, M. H., and C. Petrier. 2004. A combination of ultrasound and oxidative enzyme: sono-biodegradation of phenol. *Applied Catalysis B-Environmental* 53:257-263.
110. Bekeredjian, R., S. Y. Chen, P. A. Grayburn, and R. V. Shohet. 2004. Delivery of luciferase enzyme to the heart using ultrasound targeted microbubble destruction. *Journal of the American College of Cardiology* 43:374a-374a.
111. Entezari, M. H., and C. Petrier. 2003. A combination of ultrasound and oxidative enzyme: sono-biodegradation of substituted phenols. *Ultrasonics Sonochemistry* 10:241-246.
112. Yachmenev, V. G., N. R. Bertoniére, and E. J. Blanchard. 2002. Intensification of the bio-processing of cotton textiles by combined enzyme/ultrasound treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 77:559-567.
113. Yachmenev, V. G., E. J. Blanchard, and A. H. Lambert. 2001. Enhancement of wettability of greige cotton fabric by combined enzyme/ultrasound treatment. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 221:U178-U179.
114. Boquien, C. Y., F. Nakache, and A. Paraf. 1991. Ultrasound Treatment for Harvesting an Aminopeptidase from Lactic-Acid Bacteria and Quantitation

- of the Enzyme by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Applied and Environmental Microbiology* 57:2211-2216.
115. Berezin, I. V., A. M. Klibanov, A. A. Klyosov, K. Martinek, and V. K. Svedas. 1975. Effect of Ultrasound as a New Method of Studying Conformational Transitions in Enzyme Active-Sites - Ph-Induced and Temperature-Induced Conformational Transitions in Active-Center of Penicillin Amidase. *Febs Letters* 49:325-328.
116. Robinson, H. P., F. Sharp, H. Young, I. Donald, and A. J. Hall. 1972. Effect of Pulsed and Continuous Wave Ultrasound on Enzyme-Histochemistry of Placental Tissue in-Vitro. *Journal of Obstetrics & Gynaecology of the British Commonwealth* 79:821-&.
117. Farkas, K., M. Keller, and D. Tanka. 1965. Enzyme Histochemical Changes on Exposure to Ultrasound. *Acta Morphologica Academiae Scientiarum Hungaricae* S:67-&.
118. Crum, L. A., and A. I. Eller. 1970. Motion of Bubbles in a Stationary Sound Field. *Journal of the Acoustical Society of America* 48:181-&.
119. Groschl, H., W. Burger, and B. Handl. 1998. Ultrasonic separation of suspended particles - Part III: Application in biotechnology. *Acustica* 84:815-822.
120. Trampler, F., S. A. Sonderhoff, P. W. S. Pui, D. G. Kilburn, and J. M. Piret. 1994. Acoustic Cell Filter for High-Density Perfusion Culture of Hybridoma Cells. *Bio-Technology* 12:281-284.
121. Benes, E., M. Groschl, H. Nowotny, F. Trampler, T. Keijzer, H. Bohm, S. Radel, L. Gherardini, J. J. Hawkes, R. Konig, and C. Delouvroy. 2001. Ultrasonic separation of suspended particles. 2001 Ieee Ultrasonics Symposium Proceedings, Vols 1 and 2:649-659, 1754.
122. Gaida, T., O. Doblhoff-Dier, K. Strutzenberger, H. Katinger, W. Burger, M. Groschl, B. Handl, and E. Benes. 1996. Selective retention of viable cells in ultrasonic resonance field devices. *Biotechnology Progress* 12:73-76.
123. Hubener, H. J., H. J. Gollmick, K. Tesser, W. Lippert, and L. Rossberg. 1959. Über Die Extraktion Von Mikroorganismen Durch Ultraschall Mit Einer Neuen Apparatur. *Biochemische Zeitschrift* 331:410-421.
124. Groschl, M. 1998. Ultrasonic separation of suspended particles - Part II: Design and operation of separation devices. *Acustica* 84:632-642.
125. TF Instruments Inc. | Suite 105A | 11 Deer Park Dr. | Monmouth Junction, N., USA | www.tf-instruments.com.
126. Eggers, F. 1997. Model calculations for ultrasonic plate - liquid - plate resonators: peak frequency shift by liquid. *Meas. Sci. Technol.* 8 643-647.
127. Cavegn, M., R. Douglas, G. Akkermans, and M. Kuentz. 2011. Study of an Ultrasound-Based Process Analytical Tool for Homogenization of Nanoparticulate Pharmaceutical Vehicles. *Wiley Online Library*.
128. Sartorius. 2010. Catalog.
129. Stanke, M. 2009. Erstellung einer Auswertungssoftware zur online Analyse von Proteinen mittels Ultraschall. In *Institut für Technische Chemie Leibniz Universität Hannover, Hannover*.

130. Del Grosso, V. A., Mader, C. W. 1972. Speed of Sound in Pure Water. *J. Acoust. Soc. Am.* 52:1442-1446.
131. Shin, G.-S. 1997. Die Temperaturabhängigkeit der Ultraschallgeschwindigkeit in biologischen Medien. In Fachbereich für Physik. Freie Universität Berlin, Berlin.
132. F. Lottspeich, H. Z. 1998. Bioanalytik. Akad. Verl. Spektrum.
133. Wilson, E. K. 2007. A renaissance for Hofmeister. *Chemical & Engineering News* 85:47-49.
134. Schaafs, W. 1967. Concentration Zone Effect in Highly Viscous Solutions of Polymeric Substances. *Kolloid-Zeitschrift and Zeitschrift Fur Polymere* 221:61-&.
135. Koga, Y., P. Westh, J. V. Davies, K. Miki, K. Nishikawa, and H. Katayanagi. 2004. Toward understanding the Hofmeister series. 1. Effects of sodium salts of some anions on the molecular organization of H₂O. *Journal of Physical Chemistry A* 108:8533-8541.
136. Baldwin, R. L. 1996. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical Journal* 71:2056-2063.
137. Dreyer, S. E. 2008. Aqueous two-phase extraction of proteins and enzymes using tetraalkylammonium-based ionic liquids. In Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät. Universität Rostock, Rostock.
138. Kunz, W., J. Henle, and B. W. Ninham. 2004. 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 9:19-37.
139. Zhao, H. 2006. Are ionic liquids kosmotropic or chaotropic? An evaluation of available thermodynamic parameters for quantifying the ion kosmotropicity of ionic liquids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81:877-891.
140. Omta, A. W., M. F. Kropman, S. Woutersen, and H. J. Bakker. 2003. Negligible effect of ions on the hydrogen-bond structure in liquid water. *Science* 301:347-349.
141. Wlodawer, A., Gilliland, G.L. 1988-06-10 (Release: 1988-10-09; Last Modified (REVDAT): 2011-07-13). Structure of RNase A. PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?job=summary&pdbId=7rsa>.
142. PDB Protein Data Base. 2011. <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>.
143. SIGMA-ALDRICH. 2011. Product Information.
144. Kartha, G., J. Bello, and D. Harker. 1967. Tertiary Structure of Ribonuclease. *Nature* 213:862-&.
145. Nagendra, H. G., Sudarsanakumar, C., Vijayan, M. 1995-12-31 (Release: 1996-07-11, Last Modified (REVDAT): 2009-02-24). Structure of lysozyme. PDB <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1UCO>.
146. Jolles, P., and J. Jolles. 1984. Whats New in Lysozyme Research - Always a Model System, Today as Yesterday. *Molecular and Cellular Biochemistry* 63:165-189.
147. P.Kuhnert, B. M. Handbuch Lebensmittelzusatzstoffe. Behr's Verlag.

148. R. Lodi, V. M. 1985. Effetto del lisozima sulle microflora casearie ed anti-casearie. *Latte* 10:549.
149. Razeto, A., Galunsky, B., Kasche, V., Wilson, K.S., Lamzin, V.S. 2005-01-31 (Release: 2006-02-14, Last Modified (REVDAT): 2009-02-24). Structure of chymotrypsin. PDB <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1YPH>.
150. Gray, C. J. 1976. Enzym-katalysierte Reaktionen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
151. www.chemgapedia.de.
152. Jachmann, N. 2001. Flüssigchromatographische Bestimmung aliphatischer und aromatischer Amine mit 4-Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol. In Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät. Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Münster.
153. Rossky, P. J. 2008. Protein denaturation by urea: Slash and bond. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:16825-16826.
154. Das, A., and C. Mukhopadhyay. 2008. Atomistic mechanism of protein denaturation by urea. *Journal of Physical Chemistry B* 112:7903-7908.
155. Frohlich, O., and S. C. Jones. 1987. Denaturation of a Membrane-Transport Protein by Urea - the Erythrocyte Anion-Exchanger. *Journal of Membrane Biology* 98:33-42.
156. Hamaguchi, K. 1956. Studies on Protein Denaturation by Surface Chemical Method .3. The Interaction of Urea with Lysozyme Monolayer. *Journal of Biochemistry* 43:83-92.
157. Frensdorff, H. K., M. T. Watson, and W. Kauzmann. 1953. The Kinetics of Protein Denaturation .5. The Viscosity of Urea Solutions of Serum Albumin. *Journal of the American Chemical Society* 75:5167-5172.
158. Waldmann, J. 2005. Effect of L-arginine and guanidinium chloride (GdmCl) on the unfolding and refolding of hen egg-white lysozyme (HEWL). Halle.
159. Rydel. 2003. Patatin The 3-dimensional structure of the potato storage tuber protein patatin revealed a surface accessible Ser-Asp catalytic dyad (Ser77, Asp 215, magenta). *Biochemistry*.
160. Bowman Birk, M. H. W., D.E.Wemmer. 1992. Three-dimensional structure of soybean trypsinchymotrypsin Bowman-Birk inhibitor in solution. *Biochemistry* 31:999.
161. Speransky, A. 2007. Kunitz-type protease inhibitors group B from *Solanum palustre*. *Biotechnol J*.
162. Shewry, P. R. 2003. Tuber storage proteins. *Annals of Botany* 91:755-769.
163. Hirschberg, H. J. H. B., J. W. F. A. Simons, N. Dekker, and M. R. Egmond. 2001. Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *European Journal of Biochemistry* 268:5037-5044.
164. Hill, A. J., S. R. Peikin, C. A. Ryan, and J. E. Blundell. 1990. Oral-Administration of Proteinase Inhibitor-Ii from Potatoes Reduces Energy-Intake in Man. *Physiology & Behavior* 48:241-246.

165. Schoenbeck, I. 2010. Hochwertige Proteine und Peptide aus Kartoffelfruchtwasser. In Symposium "Bioaktive Inhaltsstoffe für funktionelle Lebensmittel". Institut für Technische Chemie, Hannover.
166. Pouvreau, L., H. Gruppen, S. R. Piersma, L. A. M. van den Broek, G. A. van Koningsveld, and A. G. J. Voragen. 2001. Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:2864-2874.
167. Alain-Michel Graf, R. S., Martin Lotz, Nils Tippkötter, Cornelia Kasper, Sascha Beutel, Roland Ulber. 2009. Downstream-Processing mit Membranadsorbern zur Isolierung nativer Proteinfractionen aus Kartoffelfruchtwasser. *Chemie Ingenieur Technik* 81:267-274.
168. Schoenbeck, I. 2011. Patatin. In Institut für Technische Chemie. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Hannover.
169. Hoffbrand, A. V. 2003. *Grundkurs Hämatologie*. Blackwell Verlag.
170. Schlegel. 1981. *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme-Verlag Stuttgart.
171. C. Oefner, A. D. A., F. K. Winkler, B. Eggimann, M. Hosang. 1992. Crystal structure of human platelet-derived growth factor BB. *EMBO J.* 11:3921-3926.
172. S. Craig, J. M. C., A. L. Cook, D. T. F. Dryden, D. R. Green, K. Heremans, P. M. Kirwin, M. J. Price, A. Fallon. 1992. Characterization of the structure and conformation of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) and proteinase-resistant mutants of PDGF-BB expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 281:67-72.
173. Weise, D. 2011. BMBF-Bericht_Februar2011 Frau Weise. Technische Universität Dortmund AK Winter, Dortmund.
174. Cellgenix. 2010. Kurzexperimenten-Protokoll „HPLC-Versuche bzgl. Verdünnung und Oligomerisierung“ vom 29.01. - 02.02.2010.
175. Cellgenix. 2010. Kurzexperimenten-Protokoll „weitere HPLC-Versuche - Optimierung“ vom 16.02. - 18.02.2010.
176. MacFarlane, D. R., S. A. Forsyth, and J. M. Pringle. 2004. Ionic liquids - An overview. *Australian Journal of Chemistry* 57:113-119.
177. Olivier-Bourbigou, H., and V. Lecocq. 2003. Ionic liquids as new solvents and catalysts for petrochemical and refining processes. *Science and Technology in Catalysis* 2002 145:55-60.
178. Vo-Thanh, G., O. N. Van Buu, A. Aupoix, and N. D. T. Hong. 2009. Chiral ionic liquids derived from isosorbide: synthesis, properties and applications in asymmetric synthesis. *New Journal of Chemistry* 33:2060-2072.
179. Olivier-Bourbigou, H., L. Magna, and D. Morvan. 2010. Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications. *Applied Catalysis a-General* 373:1-56.
180. Olivier-Bourbigou, H., and L. Magna. 2002. Ionic liquids: perspectives for organic and catalytic reactions. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical* 182:419-437.

181. Frade, R. F. M., and C. A. M. Afonso. 2010. Impact of ionic liquids in environment and humans: An overview. *Human & Experimental Toxicology* 29:1038-1054.
182. Ramunno. 2010. Posterpräsentation Dechema-Jahrestagung. Aachen.
183. Vercher, E., A. V. Orchills, P. J. Miguel, and A. Martinez-Andreu. 2007. Volumetric and ultrasonic studies of 1-ethyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate ionic liquid with methanol, ethanol, 1-propanol, and water at several temperatures (vol 52, pg 1468, 2007). *Journal of Chemical and Engineering Data* 52:2543-2543.
184. BMVIT, B. f. V., Innovation und Technologie. 2008. <http://www.biogas-netzeinspeisung.at/technische-planung/aufbereitung/entfeuchtung/entfeuchtung-triethylenglykol.html>.
185. IFA, G.-S. d. Triethylenglykol.
186. Nikos G. Tsierkezos, M. M. P. 2008. Ultrasonic studies of liquid mixtures of either water or dimethylsulfoxide with ethylene glycol, diethylene glycol, triethylene glycol, tetraethylene glycol, 1,2-propylene glycol and 1,4-butylene glycol at 298.15K. *Physics and Chemistry of Liquids* 47:447-459.
187. Patel, N. V. S. a. M. C. 2003. *J. Chem. Eng. Data* 48:1019
188. G. Douhe´ret, M. I. D., I.J. Fjellanger, and H. Hiland. 1997. *J. Chem. Soc. Faraday Trans* 93:1943.
189. TRACE Analytics, G. 2010. Braunschweig.
190. Künnecke, W. a. M. H. TRACE Analytics GmbH, Richard-Wagner-Str.1, 38106 Braunschweig, Germany.
191. KNAUER. 2007. Knauer Online Degasser Handbuch V7620 03/2007. A. A. S. I. KNAUER, editor.
192. Otto, M. 1997. *Chemometrie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
193. Pohl, F. M. 1968. A Simple Temperature-Elevation Technic from Seconds to Hours and Reversible Denaturation of Chymotrypsin. *European Journal of Biochemistry* 4:373-&.
194. G. Bohm, R. M., R. Jaenicke. 1992. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* 5:191-195.
195. S. Beutel, T. S. 2008. Skript zum Block Proteinreinigung und Aufarbeitung im Modul Proteinchemie II.
196. GmbH, A. P. 2009. DSA 5000 Dichte- und Schallgeschwindigkeitsmessgerät.

8 Lebenslauf

Ausbildung

2011	Promotion am Institut für Technische Chemie, Thema: vorliegende Arbeit
06/2008-12/2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin Gottfried Wilhelm Leibniz-Universität Hannover, unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper
08/2007-03/2008	Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz-Universität Hannover, unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper; Note: 1,3
10/2002-04/2008	Chemiestudium Gottfried Wilhelm Leibniz-Universität Hannover, Schwerpunkt Technische Chemie; Note: 2,4
1995-2002	Schulische Ausbildung Otto-Hahn-Gymnasium, 31832 Springe Abschluss: Allgemeine Hochschulreife; Note: 2,1

Publikationsliste

Im Rahmen des Projektes

(09/2010) *Vortrags-/Ausstellungs-/Posterbeitrag:*

Vortrag: „Onlineanalyse flüssiger Proben mittels Ultraschallresonatortechnologie“; Poster: „ProteinMonitor“ (Abschluss-Workshop „Mess- und Regelsysteme für verfahrenstechnische Fertigungsprozesse“; Weimar)

(03/2010) *Ausstellungs-/Posterbeitrag:*

„Proteinmonitor: Online Monitor zur Überwachung und Regelung der Aufreinigung von biopharmazeutischen Proteinwirkstoffen zur Herstellung von Arzneimitteln“ (10. Karlsruher Arbeitsgespräche Produktionsforschung 2010; Karlsruhe)

Veröffentlichungen

- S. Holz, I. Schoenbeck, M. Stanke, M. Hartlep, J. Peters, R. Winter, S. Beutel, B. Hitzmann, T. Scheper (2011); Onlineanalyse von Proteinen mittels Ultraschall - der „PROTEINMONITOR“; Einreichung eines Kurzpapiers zur Veröffentlichung im Tagungsband „Dresdner Beiträge zur Sensorik“, TUPress Verlag der Wissenschaften GmbH
- S. Holz, M. Stanke, M. Hartlep, J. Peters, R. Winter, P. Lindner, S. Beutel, B. Hitzmann, T. Scheper (2011); Analytical protein monitoring by using ultrasonic waves; Einreichung eines Kurzpapiers zur Veröffentlichung durch IEEE
- S. Holz, M. Stanke, M. Hartlep, W. Peters, M. Lehmann, P. Lindner, B. Hitzmann, S. Beutel, T. Scheper, R. Winter (05/2010); Online-Analyse von Proteinen mittels Ultraschall, CIT-journal 2010, 82, No. 9, S. 1407
- S. Holz, W. Künnecke, W. Peters, M. Lehmann, P. Lindner, B. Hitzmann, S. Beutel, T. Scheper, R. Winter (09/2009); Online-Analyse von Proteinen mittels Ultraschall, CIT-journal 2009, 81, No. 8, S. 1268

Vorträge

- S. Holz, M. Stanke, M. Hartlep, J. Peters, R. Winter, B. Hitzmann, T. Scheper (12/2011); Onlineanalyse von Proteinen mittels Ultraschall „PROTEIN-MONITOR“ (10. Dresdner Sensorsymposium 10. DSS; Dresden)
- S. Holz, M. Hartlep, J. Peters, R. Winter, S. Beutel, B. Hitzmann, T. Scheper (06/2011); Analytical protein monitoring by using ultrasonic waves” (10th Workshop on (Bio)sensors and Bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis (bbmec2011); Weimar)
- S. Holz, M. Hartlep, J. Peters, R. Winter, S. Beutel, B. Hitzmann, T. Scheper (03/2011); Analytical protein monitoring by using ultrasonic waves (13th JCF-Frühjahrssymposium; Erlangen)
- S. Holz, M. Stanke, M. Hartlep, J. Peters, B. Hitzmann, T. Scheper, R. Winter (09/2010); Onlineanalyse von Proteinen mittels Ultraschall (ProcessNet-Jahrestagung 2010 und 28. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen; Aachen)

- S. Holz, M. Stanke, M. Hartlep, W. Peters, M. Lehmann, P. Lindner, B. Hitzmann, S. Beutel, T. Scheper, R. Winter (05/2010); Onlineanalyse von Proteinen mittels Ultraschall (GVC/DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung „Bioprozessorientiertes Anlagendesign“; Nürnberg)
- S. Holz, W. Künnecke, W. Peters, M. Lehmann, P. Lindner, B. Hitzmann, S. Beutel, T. Scheper, R. Winter (09/2009); Online Analyse von Proteinen mittels Ultraschall (ProcessNet-Jahrestagung 2009 und 27. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen; Mannheim)

Poster

- S. Holz, M. Stanke, M. Hartlep, J. Peters, R. Winter, P. Lindner, S. Beutel, B. Hitzmann, T. Scheper (11/2011); Analytical protein monitoring by using ultrasonic waves (CET 2011; Shanghai)